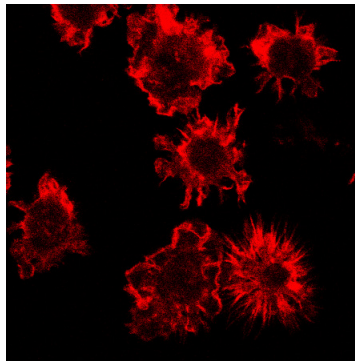




**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**REGULACIÓN POR LOVASTATINA DE LA
ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS
DENDRÍTICAS INFLAMATORIAS**



TESIS DOCTORAL

PILAR DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ
Madrid, Diciembre 2010

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC (Madrid), bajo la dirección del **Doctor Carlos Fernández-Ardavín Castro**.

A Alberto

ÍNDICE

7	ÍNDICE
13	ABREVIATURAS
19	SUMMARY
23	INTRODUCCIÓN
25	<u>Estatinas</u>
25	Mecanismos de acción
27	Tipos y estructura
28	Estatinas y sistema inmune
28	Efectos anti-inflamatorios
29	Enfermedades autoinmunes
29	Efecto sobre la polarización de respuestas Th
30	Efectos proinflamatorios
31	<u>Células dendríticas</u>
32	Origen y diferenciación de las DC
34	Subpoblaciones de cDC en homeostasis
34	cDC residentes
36	cDC migratorias
37	DC inflamatorias
38	Monocitos como precursores de DC y macrófagos
38	Subpoblaciones de monocitos de ratón
38	Monocitos Ly-6C ^{low}
39	Monocitos Ly-6C ^{high}
39	Diferenciación a macrófagos
39	Diferenciación a DC
42	TipDC
43	Función efectora de las DC
43	Reconocimiento de patógenos
44	TLRs
47	Receptores citoplásmicos
49	Activación de las DC
50	Inducción de respuestas inmunológicas
51	OBJETIVOS
55	MATERIALES Y MÉTODOS
57	<u>Materiales Biológicos</u>
57	Ratones

57	Líneas celulares y patógenos
57	<u>Reactivos</u>
57	Medios de cultivo
57	Anticuerpos monoclonales (mAbs)
58	Proteínas y Péptidos
58	Primers para qRT-PCR
58	Estímulos
58	<u>Metodología</u>
58	Preparaciones celulares
59	Aislamiento de poblaciones celulares
60	Cultivos celulares
61	Microscopía Confocal
62	Western Blot
63	Tinción GIEMSA
63	PCR cuantitativa
64	Producción de citoquinas
65	Ensayos <i>in vivo</i>
65	Análisis de la carga bacteriana
66	Citometría de Flujo
69	RESULTADOS
71	Diferenciación de moDC en presencia de lovastatina
73	Respuesta a LPS de las stat-moDC
73	Caracterización fenotípica de las stat-moDC tras activación con LPS
74	Capacidad de las stat-moDC de estimulación <i>in vitro</i> de células T
76	Capacidad de las stat-moDC de estimulación <i>in vivo</i> de células T
77	Producción de citoquinas tras la activación de las stat-moDC con LPS
78	Señalización mediada por TLR-4 en moDC activadas con LPS
78	Señalización dependiente de MyD88 en las stat-moDC estimuladas con LPS
80	Señalización dependiente de TRIF en las stat-moDC estimuladas con LPS
81	Señalización dependiente de IFNAR tras la estimulación de las moDC con LPS
81	Producción autocrina de IFN de tipo I en las moDC estimuladas con LPS
83	Regulación del metabolismo del óxido nítrico en las stat-moDC estimuladas con LPS

83	Contribución de la vía de IFNAR al metabolismo del NO en las moDC estimuladas con LPS
86	Regulación de la producción de citoquinas por TLR-4 e IFNAR en las moDC activadas con LPS
87	Regulación de la expresión de moléculas de coestimulación por TLR-4 e IFNAR en las moDC activadas con LPS
88	Reversión de los efectos de la lovastatina sobre la respuesta a LPS de las moDC por la adición de mevalonato
90	Potencial de citoprotección de las stat-moDC estimuladas con LPS
91	Respuesta de las stat-moDC frente al estrés oxidativo inducido por LPS
92	Regulación del metabolismo del óxido nítrico en las moDC durante la infección por <i>Listeria monocytogenes</i>
93	Análisis de las poblaciones celulares presentes en el bazo durante la infección por <i>Listeria monocytogenes</i>
97	Células productoras de NO en el bazo durante la infección por <i>Listeria monocytogenes</i>
99	Eficiencia en la eliminación de la bacteria en el bazo de ratones infectados con <i>Listeria</i> y pretratados con lovastatina
103	DISCUSIÓN
107	Respuesta de las stat-moDC a la activación por LPS
109	Contribución de la señalización autocrina por IFNAR a la producción de citoquinas y al metabolismo del NO en las moDC activadas por LPS
111	Regulación por lovastatina de la señalización por TLR-4 e IFNAR en las stat-moDC activadas por LPS
114	Efecto de la lovastatina sobre la producción de NO por las moDC durante la infección por <i>Listeria monocytogenes</i>
117	CONCLUSIONES
121	BIBLIOGRAFÍA
137	ANEXO
171	AGRADECIMIENTOS

AP-1:	proteína activadora 1
APCs:	células presentadoras de antígenos
APC:	aloficocianina
BMDC:	células dendríticas derivadas de médula ósea
CCR:	receptor de quimioquinas
CD:	antígeno de diferenciación
cDCs:	células dendríticas convencionales
CDP:	precursor común de células dendríticas
CFSE:	carboxifluoresceína
CLP:	precursor linfoide común
CLR:	receptor lectina tipo C
CMP:	precursor mieloide común
CpG:	oligodesoxinucleótidos desmetilados de citosina y guanina
CTLs:	linfocitos T citotóxicos
DC:	células dendríticas
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA:	ensayo colorimétrico
eNOS:	sintasa de óxido nítrico de células endoteliales
ERK:	quinasa regulada por señales extracelulares
FcR:	receptor de la fracción constante de la inmunoglobulina
FCS:	suero fetal de ternera
FDA:	<i>food and drug administration</i>
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
Flt3:	<i>fms-like tyrosin kinase</i>
Flt3-L:	ligando de Flt3
FSC:	tamaño
GFP:	proteína fluorescente verde
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HSC:	células madre hematopoyéticas
Igs:	inmunoglobulinas
IL:	interleuquina
IFN:	interferón
IFNAR:	cadena α del receptor de IFN-I
IFN-I:	interferón de tipo I
IFNγ:	interferón γ
IκB:	Inhibidor de NF- κ B
iNOS:	sintasa de óxido nítrico inducible
IRAK:	quinasa asociada al receptor de IL-1
IRF:	factor regulador de interferón

ITAM:	motivo de activación basado en tirosina de un inmunoreceptor
JAK:	quinasa asociada a Janus
LCs:	células de Langerhans
LFA-1:	antígeno 1 asociado a la función leucocitaria
LN:	ganglio linfático
LPS:	lipopolisacárido bacteriano
LRR:	repeticiones ricas en leucina
mAbs:	anticuerpos monoclonales
MACS:	separación celular magnética
MAPK:	quinasa activada por mitógenos
MDP:	precursor común de células dendríticas y macrófagos
MHC:	complejo principal de histocompatibilidad.
MHC-I:	complejo principal de histocompatibilidad de tipo I
MHC-II:	complejo principal de histocompatibilidad de tipo II
moDC:	célula dendrítica derivada de monocitos
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
MyD88:	factor de diferenciación mieloide 88
NF-κB:	factor nuclear estimulador de la cadena ligera de células B activadas
NK:	célula <i>natural killer</i>
NO:	óxido nítrico
OVA:	ovalbúmina
PAMPs:	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS:	tampón fosfato salino
pDC:	célula dendrítica plasmacitoide
PE:	ficoeritrina
PerCP:	peridina de clorofila a
PNA:	adhesina de los ganglios linfáticos periféricos
poly(I:C):	análogo sintético de RNA de doble hélice
pre-DC:	precursor de células dendríticas convencionales
PRRs:	receptores de reconocimiento de patrones
PSGL-1:	glicoproteína de unión a P-selectina
RT-PCR:	transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
SSC:	complejidad
STAT:	factor transductor de señales y activador de la transcripción
TCR:	receptor de la célula T
Th:	células T colaboradoras
Th1:	células Th de tipo 1
Th2:	células Th de tipo 2
Th17:	células Th de tipo 17

TIRAP:	molécula adaptadora que contiene un dominio TIR
TLRs:	receptores <i>Toll-like</i>
TNFα:	factor de necrosis tumoral α
TRAF:	factor asociado al receptor de TNF
TRAM:	molécula adaptadora relacionada con TRIF
TRIF:	proteína adaptadora que contiene un dominio TIR y que produce IFN β
VEGF:	factor de crecimiento del endotelio vascular

SUMMARY

Statins are drugs with multiple lipid-lowering effects such as the inhibition of endogenous cholesterol synthesis, the increase in uptake and degradation of LDL and the blockade of lipoprotein secretion. Statins are prescribed to 25-million people worldwide for treating hypercholesterolemia and reducing the risk of atherosclerosis and heart attack. Since people with or at risk of cardiovascular disease are subjected to statin treatment for long periods, or even during lifetime, the potential side effects of such treatments have to be taken into consideration. A number of reports have addressed the influence of statins on the immune system, but they have not led to definitive conclusions since data derived from these studies are controversial. In this sense, although recent data have revealed that statins can promote proinflammatory effects on dendritic cells (DC), they are generally considered anti-inflammatory drugs. Besides, since DCs are responsible for the induction of T cell responses against pathogens and tumors, and for the presentation of self-antigens during autoimmune diseases, an in depth-analysis of the effect of statins on DC function had to be performed. In this work we have investigated the impact of lovastatin on the responsiveness of monocyte-derived DCs (moDCs) to TLR-mediated activation. Lovastatin caused a positive regulation of TLR-4 signaling that was paralleled by a higher activation of p38 MAP-kinase, leading to an increased proinflammatory cytokine and IFN- β production. In contrast, lovastatin promoted a negative regulation of IFN- β -mediated autocrine signaling, paralleled by a lower expression of the transcription factor IRF-1, leading to the inhibition of the enzymes iNOS and HO-1. Interestingly, iNOS/HO-1 activation and NO production by LPS-stimulated moDCs was strictly controlled by autocrine signalling through the type-I IFN receptor IFNAR. Defective iNOS/HO-1 activation on moDCs resulted in limited cytoprotective capacity against ROS and reduced microbicidal potential. These *in vitro* data were validated using an *in vivo* model of *Listeria* infection that revealed that iNOS activation by splenic inflammatory mo-DCs was strongly reduced in lovastatin treated mice. Statin treatment could therefore have severe implications during immune responses in which defective activation of iNOS/HO-1 metabolism might lead to a failure of immunity.

INTRODUCCIÓN

1 ESTATINAS

Las estatinas son potentes inhibidores de la síntesis de colesterol y, por este motivo, son utilizadas comúnmente como fármaco para el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia o que padecen enfermedades cardiovasculares; además se administran de forma preventiva en personas con riesgo de desarrollar aterosclerosis o sufrir un ataque al corazón. En la actualidad más de 25 millones de personas en todo el mundo son tratadas con algún tipo de estatina, y se prevé que su uso continúe aumentando debido a la elevada incidencia que las enfermedades descritas anteriormente tienen en nuestra sociedad. Por otra parte, el tratamiento con estatinas conlleva su administración prolongada durante largos períodos de tiempo, incluso puede extenderse a toda la vida; por lo tanto, se requiere un análisis en profundidad de los posibles efectos secundarios que pueden derivarse del tratamiento continuado con estatinas.

1.1 Mecanismo de acción

Las estatinas son inhibidores de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que cataliza la conversión de la HMG-CoA a L-mevalonato, uno de los pasos limitantes en la ruta de biosíntesis del colesterol ([Figura 11](#)); se unen a la HMG-CoA reductasa a una concentración del rango nanomolar, lo que les permite desplazar al sustrato natural HMG-CoA, que actúa a concentraciones micromolares (Istvan and Deisenhofer, 2001). Como consecuencia de la acción de las estatinas se inhibe la síntesis endógena de colesterol; además la disminución en los niveles de colesterol activa proteínas con elementos de respuesta a esteroides, que inducen la transcripción del gen para el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL), aumentando su síntesis y posterior expresión en la membrana. Como el receptor de LDL se encarga de la captura de las moléculas de LDL-colesterol, el tratamiento con estatinas reduce indirectamente los niveles de colesterol circulante.

Las estatinas tienen efectos independientes de su acción sobre el metabolismo de los lípidos, que afectan a la función de la célula (Liao, 2002). La inhibición del L-mevalonato conlleva el bloqueo de la generación de isoprenoides derivados de la síntesis del colesterol, como el 15-carbono farnesilpírofosfato (FPP) y el 20-carbono geranilgeranilpírofosfato (GGPP) ([Figura 11](#)). Estos metabolitos intermedios modifican lípidicamente a nivel post-transduccional multitud de proteínas de señalización celular para que puedan llevar a cabo su función biológica; en concreto, la isoprenilación permite a las proteínas asociadas a membrana tanto el anclaje covalente a la membrana, como la localización subcelular y el tráfico dentro de la célula (Zhang and Casey, 1996). Para que las proteínas puedan prenilarse es necesario que posean un dominio carboxi-terminal CaaX (donde C es cisteína, a es un aminoácido alifático y X es cualquier aminoácido). Entre las proteínas susceptibles de modificación por isoprenilación, y que por lo tanto pueden ser diana indirecta de las estatinas, se encuentran miembros de la familia de Ras y Rho GTPasas. Las GTPasas reciben el nombre por su capacidad intrínseca

para metabolizar GTP y son proteínas implicadas en numerosos procesos celulares: expresión génica, regulación del citoesqueleto de actina, proliferación, apoptosis y migración (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Las Rho GTPasas se encargan de regular las vías inflamatorias asociadas a JNK y p38 MAPK, y típicamente están geranilgeraniladas; sin embargo, las proteínas de la familia Ras, que transducen señales inducidas por receptores de factores de crecimiento y regulan ERK, están farnesiladas.

Esta capacidad de las estatinas para regular la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de las Ras y Rho GTPasas les confiere un gran potencial terapéutico, especialmente porque su acción resulta en un bloqueo parcial de las vías en las que están implicadas las proteínas preniladas, y no en una inhibición total de dichas vías, que sería fatal para la supervivencia de la célula.

Figura I1

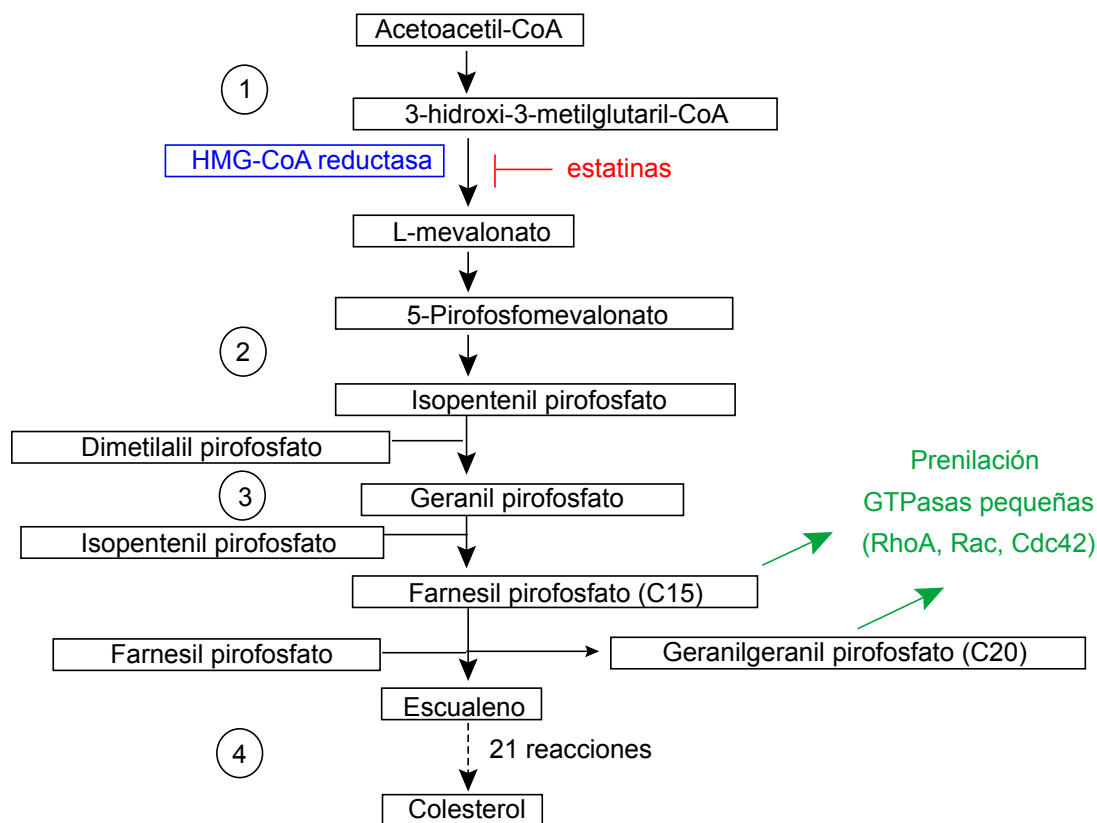


Figura I1. Ruta de la síntesis endógena de colesterol y acción de las estatinas. La vía endógena de la síntesis de colesterol tiene lugar en el retículo endoplásmico liso y está iniciada por el acetato, en su forma activada acetil-coenzima A (acetil-CoA). Consta de más de 25 reacciones que pueden agruparse de la siguiente manera: **1)** la combinación de 3 moléculas de acetil-CoA da lugar al mevalonato, que se fosforila a 5-pirofosfomevalonato; **2)** el 5-pirofosfomevalonato es descarboxilado y desfosforilado a isopentenil pirofosfato; **3)** se ensamblan 6 moléculas de isopentenil pirofosfato para originar escualeno, mediante la generación de geranil pirofosfato y farnesil pirofosfato; **4)** la ciclación del escualeno conduce a la formación de lanosterol, el cual se convierte en colesterol después de numerosas reacciones sucesivas. Las estatinas inhiben de forma competitiva la enzima hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que cataliza la conversión de la HMG-CoA a L-mevalonato y es la enzima limitante en la vía biosintética del colesterol. Esta inhibición interfiere en la formación de isoprenoides, como el farnesil pirofosfato y el geranilgeranil pirofosfato, que sirven como etiquetas lipídicas para la modificación postraduccional de una gran variedad de proteínas, incluyendo las proteínas pequeñas que unen GTP (GTPasas).

1.2 Tipos y estructura

La mevastatina fue el primer compuesto con capacidad para inhibir la HMG-CoA reductasa identificado; se aisló del hongo *Penicillium citrinum* en 1976, demostrándose su potencial para inhibir la colesterogénesis (Endo et al., 1976). Debido al éxito de la mevastatina, se intentaron aislar otros compuestos similares, hasta el descubrimiento de la lovastatina en 1980 (Alberts et al., 1980). Posteriormente, se modificaron estas estatinas naturales o de tipo 1 para conseguir compuestos más eficaces, desarrollándose estatinas sintéticas y semi-sintéticas, denominadas de tipo 2. Las estatinas semi-sintéticas son análogas a la mevastatina y lovastatina con alguna modificación química, lo que significa que derivan de la fermentación fúngica al igual que las estatinas naturales; dentro de este grupo se encuentran la simvastatina y la pravastatina. Sin embargo, las estatinas sintéticas son totalmente artificiales; la fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, rosuvastatina y pitavastatina pertenecen a este último grupo. La estructura de cada tipo de estatina está representada en la [Figura I2](#).

Figura I2

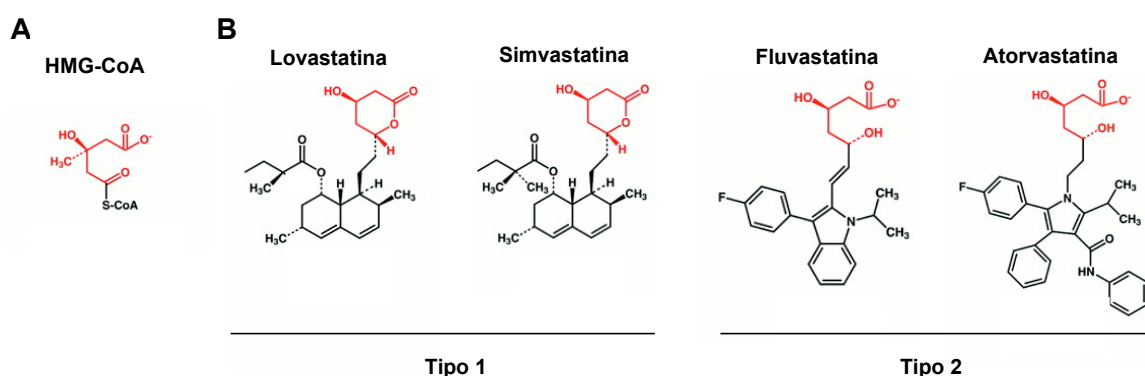


Figura I2. Estructura química de la HMG-CoA y de los diferentes tipos de estatina. A. Fórmula estructural de la HMG-CoA, sustrato de la HMG-CoA reductasa, con la fracción HMG señalada en rojo. B. Estructura de dos estatinas naturales o de tipo 1: Lovastatina y Simvastatina; y de dos estatinas totalmente sintéticas o de tipo 2: Fluvastatina y Atorvastatina. En todos los casos la parte equivalente a la fracción HMG, estructuralmente similar a la HMG-CoA, está señalada en rojo.

Además de por su origen, las estatinas pueden ser clasificadas en función de su lipofilicidad, es decir, su capacidad para disolverse en lípidos; la mayoría de las estatinas son lipofílicas, aunque algunas de las más recientemente descritas como la pravastatina y la rosuvastatina son hidrofóbicas. Una mayor lipofilicidad permite a la molécula penetrar en la membrana celular más fácilmente, lo que en teoría supone una ventaja respecto a las moléculas hidrofóbicas para llevar a cabo su acción dentro de la célula; por otro lado, al ejercer su efecto desde dentro de la células, las estatinas lipofílicas provocan más efectos secundarios. Asimismo se ha demostrado que las estatinas hidrofóbicas tienen las mismas características pleiotrópicas que las lipofílicas, es decir, ambos tipos afectan a múltiples procesos celulares (McTaggart et

al., 2001). Por lo tanto, hasta el momento no existe una correlación entre la eficacia y el nivel de lipofilicidad de las estatinas, siendo los dos subtipos equiparables.

Para el desarrollo de este trabajo se seleccionó la lovastatina entre otras estatinas porque es una de las más frecuentemente administradas para el tratamiento de la hipercolesterolemia y para reducir el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. La lovastatina se comercializó en primer lugar por la compañía farmacéutica Merck & Co. bajo el nombre de Mevacor y fue el primer tipo de estatina aprobado por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) para su uso como fármaco.

1.3 Estatinas y sistema inmune

El efecto beneficioso de las estatinas sobre las enfermedades cardiovasculares no se podía explicar solamente por su capacidad para inhibir la síntesis de colesterol y regular el metabolismo de los lípidos, lo que llevó a concluir que las estatinas tenían otras funciones además de disminuir los niveles de colesterol (Vaughan et al., 1996). Posteriormente se describió que este efecto beneficioso de las estatinas en el tratamiento de la aterosclerosis se debía a su capacidad para incrementar la expresión de eNOS (del inglés *endothelial-cell nitric oxide synthase*), enzima encargada de sintetizar óxido nítrico (NO) en las células endoteliales que se encuentra disminuida cuando hay alteraciones en el endotelio (Laufs et al., 1998). En los últimos años se ha demostrado que las estatinas tienen propiedades inmunomoduladoras que afectan a la función tanto de las células T como de las células presentadoras de antígeno (APC) (Greenwood et al., 2006) y que además son capaces de modular la respuesta inflamatoria, lo que ha incrementado su potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Sherer and Shoenfeld, 2002).

1.3.1 Efectos anti-inflamatorios

La primera evidencia de la función anti-inflamatoria de las estatinas data de 1997, cuando Pahan et al. demostraron que el tratamiento *in vitro* de macrófagos con lovastatina inhibía la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α (Pahan et al., 1997). Posteriormente, se demostró que el tratamiento con lovastatina inhibía la expresión de iNOS y la producción de NO en astrocitos de ratón estimulados con LPS (Pahan et al., 1997) y también en astrocitos primarios de rata tras la inducción de EAE (Stanislaus et al., 1999), disminuyendo de este modo la degeneración de los oligodendrocitos causada por la presencia de NO. Después se describió que las estatinas bloqueaban la inducción de moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en respuesta a interferón- γ (IFN γ) en monocitos humanos (Kwak et al., 2000); dicho fenómeno alteraba la capacidad de estas células para presentar antígenos a las células T CD4 $^{+}$, lo que sugería una posible aplicación de las estatinas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias causadas por la activación de células T. Desde entonces, diferentes estudios en modelos de ratón de enfermedades inflamatorias como la EAE, la artritis experimental o la miocarditis autoinmune experimental, así como ensayos clínicos en pacientes con esclerosis

múltiple o artritis reumatoide, han demostrado el efecto beneficioso de las estatinas, por lo que en general se considera que son agentes anti-inflamatorios (Greenwood et al., 2006).

1.3.1.1 Enfermedades autoinmunes

Las propiedades anti-inflamatorias de las estatinas se han demostrado en diferentes modelos animales de enfermedades autoinmunes. En estudios realizados en animales con enfermedades inflamatorias experimentales como colitis, uveitis, miocarditis, EAE, sepsis letal y asma, el tratamiento con estatinas se traduce en una menor severidad de la enfermedad (Abeles and Pillinger, 2006).

A la vista de estos prometedores resultados en modelos experimentales animales se ha intentado trasladar la terapia con estatinas al tratamiento de enfermedades autoinmunes en humanos. Aunque los resultados no son concluyentes, diversos estudios apoyan que el tratamiento con estatinas disminuye la inflamación que va asociada al desarrollo de estas enfermedades. En el caso de la artritis reumatoide, enfermedad sistémica autoinmune caracterizada por la inflamación crónica principalmente de las articulaciones, se han llevado a cabo más de diez ensayos clínicos con estatinas. En dichos ensayos se ha observado una moderada reducción en la inflamación de las articulaciones asociada con una reducción de la proteína C reactiva (CRP) en la sangre y una menor producción de citoquinas por los monocitos circulantes (Sena et al., 2003) (McCarey et al., 2002). Otra de las enfermedades autoinmunes más frecuentes es la esclerosis múltiple, que se caracteriza por la aparición de lesiones desmielinizantes. Estas lesiones se deben al ataque de células T autorreactivas, las cuales cruzan la barrera hematoencefálica por causas desconocidas, sobre la mielina del sistema nervioso. En un ensayo con pacientes con esclerosis múltiple en su forma denominada con recaídas y remisiones, la terapia con estatina durante seis meses provocó una disminución significativa de lesiones cerebrales; además el análisis de la sangre de estos pacientes reveló un aumento en la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Paul et al., 2008). Por lo tanto, aunque todavía es pronto para afirmarlo, el tratamiento con estatinas podría ser una alternativa a la utilización de fármacos inmunosupresores, teniendo en cuenta además su fácil administración por vía oral y la elevada tolerancia de los pacientes a estas drogas.

1.3.1.2 Efecto sobre la polarización de las respuestas T helper

En modelos animales de enfermedades autoinmunes la administración de estatinas impide la progresión de la enfermedad, debido en parte a la capacidad de las estatinas para modificar la polarización de las respuestas T. Los ratones tratados con atorvastatina durante el desarrollo de la encefalitis autoinmune experimental (EAE) presentan una disminución de la inflamación del sistema nervioso central, que se correlaciona con un cambio en el patrón de citoquinas producidas por las células T. En concreto, la atorvastatina provoca un aumento en la inducción de citoquinas Th2 anti-inflamatorias (IL-4, IL-5 e IL-10) y en la fosforilación de STAT-6 (del inglés *signal transducer and activator of transcription 6*), factor de transcripción implicado en

la diferenciación Th2 dependiente de IL-4. Por el contrario, la fosforilación de STAT-4, que es un factor fundamental para la diferenciación Th1 mediada por IL-12, está inhibida y la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-12, IL-2, IFN γ y TNF α es menor (Youssef et al., 2002). Además el tratamiento con lovastatina es capaz de promover la expresión por las células T de GATA3 (proteína 3 de unión a GATA), principal factor de la diferenciación Th2, al mismo tiempo que inhibe la activación de T-bet, factor de transcripción asociado a la diferenciación Th1 (Nath et al., 2004).

Sin embargo, el tratamiento con estatinas no siempre conlleva la producción de citoquinas de tipo Th2. En un modelo de uveitis autoinmune la lovastatina inhibe la producción de IFN γ sin provocar un aumento en la producción de citoquinas Th2 (Thomas et al., 2005); lo mismo ocurre tras la administración de elevadas dosis de simvastatina en ratones con artritis inducida por colágeno (Leung et al., 2003). Por lo tanto, aunque parece que las estatinas son capaces de modificar el balance Th1/Th2 aún se desconoce el mecanismo por el cual lo llevan a cabo. Sin embargo, se ha demostrado que la polarización hacia Th2 mediada por la atorvastatina se puede revertir con la adición de mevalonato, lo que sugiere que el propio mevalonato o alguno de los metabolitos que se derivan de él promueve la diferenciación de las células T hacia Th1 (Youssef et al., 2002).

1.3.2 Efectos proinflamatorios

Aunque como se ha descrito anteriormente las estatinas se consideran en general agentes anti-inflamatorios, existen evidencias de que en determinados tipos celulares pueden tener un efecto proinflamatorio. En el caso de los monocitos y las células dendríticas (DC), el tratamiento con estatinas se traduce en un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias. En monocitos aislados de sangre periférica humana, las estatinas lipofílicas son capaces de inducir la síntesis de TNF α , IL-1 β , MCP-1 e IL-8 (Kiener et al., 2001). Además las DC derivadas de monocitos humanos (moDC) tratadas con estatinas producen más cantidad de IL-6, IL-8, IL-12 y TNF α tras la estimulación con LPS, lo que indica que las estatinas amplifican la respuesta inflamatoria inducida por el LPS (Yilmaz et al., 2006). Lo mismo ocurre en DC derivadas de médula ósea (BMDC) de ratón, en las que el pretratamiento con lovastatina antes de la activación con LPS provoca un aumento en la síntesis y producción de las citoquinas proinflamatorias IL-12, TNF α e IL-6 (Sun and Fernandes, 2003). Estos estudios están realizados *in vitro*, por lo que se desconoce hasta el momento el efecto que el tratamiento *in vivo* con estatinas puede tener sobre la respuesta inmune, y concretamente sobre las DC.

Teniendo en cuenta que las DC son las células responsables de la inducción de las respuestas de las células T frente a patógenos y tumores era necesario llevar a cabo un análisis en profundidad de los posibles efectos de las estatinas sobre la función de las DC. De las distintas subpoblaciones de DC, tiene especial relevancia estudiar la función de las DC inflamatorias diferenciadas en presencia de estatinas, debido al importante papel que desempeñan durante el desarrollo de procesos infecciosos. Como se describirá más adelante, las DC inflamatorias

derivan principalmente de monocitos reclutados rápidamente al sitio de infección o a los órganos linfoides secundarios y reemplazan a las DC ya existentes, denominadas residentes. Estas moDC participan tanto en la respuesta innata como adaptativa del sistema inmune. Por un lado, colaboran en la eliminación del patógeno mediante la producción de factores solubles con acción microbicida, y por otro lado, son capaces de activar a células T CD4⁺ específicas y a cross-presentar antígenos a células T CD8⁺ en las primeras fases de la infección con bacterias, virus o parásitos (Dominguez and Ardavin, 2010).

2 CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC)

Las DC son células especializadas en la presentación de antígenos a células T y, por este motivo, son elementos clave en la inducción de respuestas inmunes frente a patógenos y tumores. En la periferia las DC en estado inmaduro son capaces de captar y procesar antígenos del entorno mediante receptores de internalización y de reconocimiento de patógenos. Cuando las DC son activadas a través de alguno de estos receptores se inicia el proceso de maduración y migración hacia los órganos linfoides secundarios; una vez allí presentan los antígenos captados en la periferia a las células T y producen citoquinas, activando a las células T e iniciando de ese modo la respuesta inmune. Este proceso se conoce como el paradigma de las células de Langerhans (Wilson and Villadangos, 2004), y aunque es válido para explicar el funcionamiento de las DC migratorias, en los últimos años se ha demostrado que este paradigma no se puede aplicar de forma generalizada a los otros tipos de DC (Villadangos and Heath, 2005). Es el caso de las DC residentes, que se diferencian directamente en los órganos linfoides secundarios a partir de precursores reclutados desde la sangre. Además de presentar antígenos a las células T, las DC pueden llevar a cabo otras funciones en el inicio de la respuesta frente a patógenos, debido a la enorme heterogeneidad de los distintos tipos en cuanto a función, marcadores de superficie y localización.

Por otra parte, las DC participan en la inducción de tolerancia tanto central como periférica. En el timo, las DC participan en la tolerancia central induciendo la delección de células T autorreactivas; sin embargo, las células T que reconocen antígenos propios con muy baja afinidad pueden escapar a la selección tímica. Para eliminar estas células T autorreactivas de la periferia existe la denominada tolerancia periférica, en la que participan las DC mediante diversos mecanismos. Por un lado, la presentación de auto-antígenos a células T por parte de DC inmaduras, es decir, en ausencia de coestimulación, induce un estado de anergia en la célula T autorreactiva, que implica su incapacidad para proliferar y producir IL-2 (Kapsenberg, 2003). Asimismo las DC tolerogénicas pueden inducirse tras la exposición a citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10 o el TGFβ producidas por las Treg (Chen et al., 2001), a inductores de AMP cíclico como prostaglandina E₂ y 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ (Morelli and Thomson,

2007), o mediante la captura de células apoptóticas (Steinman et al., 2000). Además las DC tolerogénicas pueden promover la expansión de células T reguladoras (Treg), que tienen la capacidad de suprimir la respuesta de células T efectoras (Steinman and Nussenzweig, 2002). En este sentido se ha descrito que las CD8⁺ DC del bazo están especializadas en la inducción de Treg Foxp3⁺ (Yamazaki et al., 2008). Otro mecanismo por el cual las DC promueven la inducción de tolerancia implica el catabolismo del triptófano a través de la enzima IDO (del inglés *indoleamine 2,3-dioxygenase*). Se ha propuesto que IDO se induce en las DC tras la interacción de CD80/CD86 con la molécula CTLA4 (del inglés *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) expresada en las células T, y requiere la señalización a través de IFN γ (Mellor and Munn, 2004). La actividad de esta enzima conlleva la privación para las células T del triptófano del medio y además genera metabolitos, como las kinureninas, que tienen un efecto supresor sobre las células T (Stone and Darlington, 2002).

2.1 Origen y diferenciación de DC

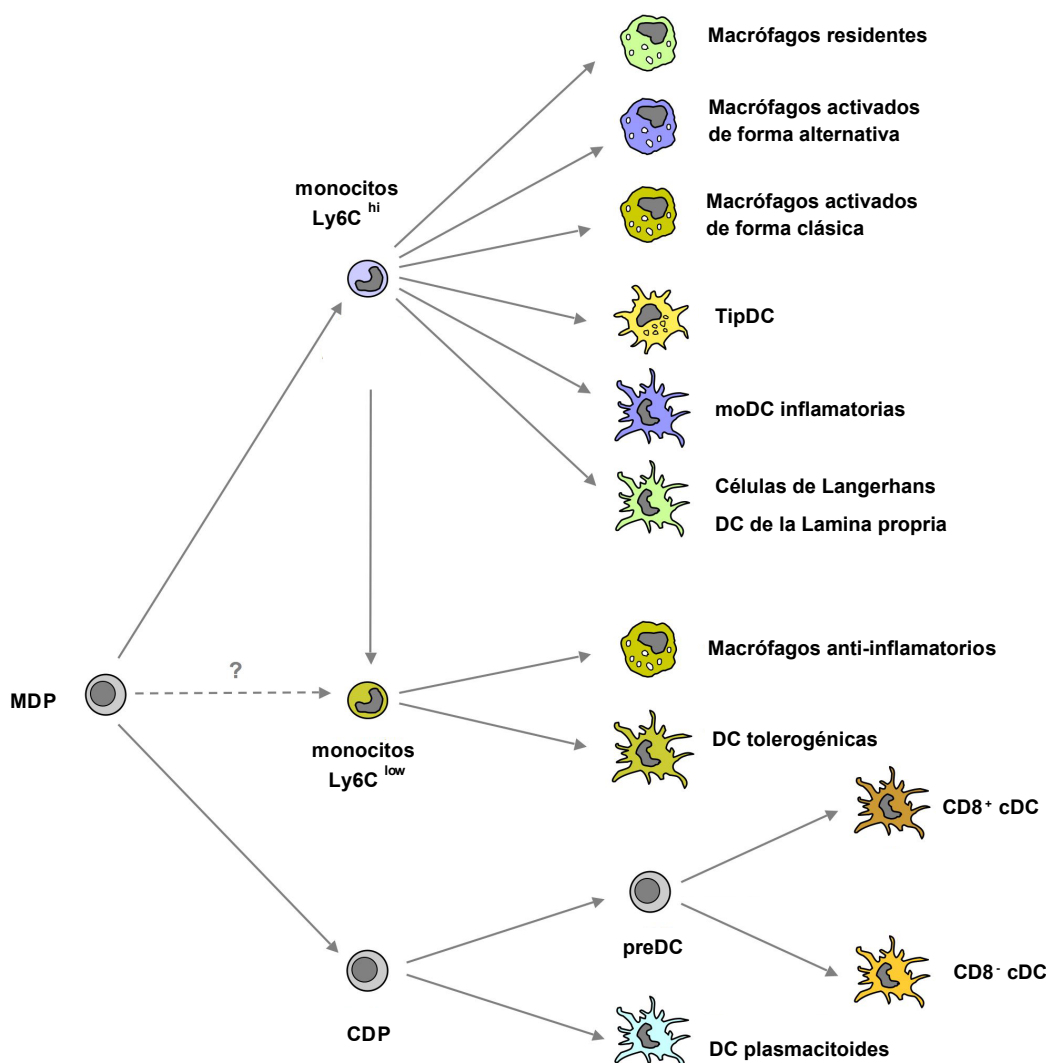
Las DC se diferencian en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas (HSC). La divergencia entre linaje linfóide y mielóide es un fenómeno muy temprano de la hematopoyesis; los monocitos, macrófagos, granulocitos, megacariocitos y eritrocitos se diferencian de un precursor común mielóide (**CMP**), mientras que las células B, células T y células NK derivan de precursor común linfóide (**CLP**) (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997). Las DCs pueden generarse tanto a partir de la fracción de precursores restringidos a linaje mielóide como linfóide, en ambos casos, a partir de la fracción Flt3⁺ (D'Amico and Wu, 2003); sin embargo, como los CMPs son 10 veces más abundantes que los CLPs, la mayoría de las DC del bazo y una fracción importante de las DC del timo derivan de CMPs (Manz et al., 2001).

Flt3 (también llamado Flk-2) es un receptor tirosina quinasa altamente expresado en los progenitores de las células hematopoyéticas (Lyman and Jacobsen, 1998). La definición de la expresión de Flt3 por los precursores de las DC (Karsunky et al., 2003) supuso el punto de partida para empezar a resolver la cuestión de la diferenciación de este tipo celular. Esta información permitió la identificación en la médula ósea de un precursor común para monocitos, macrófagos y DC denominado **MDP** (del inglés *macrophage-DC progenitor*) (Fogg et al., 2006), cuyo fenotipo es Lin⁻CX3CR1⁺CD11b⁻CD115⁺C-kit⁺CD135⁺ y que representa un 0,5% de todas las células mononucleares de la médula ósea del ratón; cuando los MDP se cultivaban *in vitro* con el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o se transferían de forma adoptiva en ratones generaban macrófagos y DC, pero no neutrófilos, células B, células T o células NK (Fogg et al., 2006; Waskow et al., 2008) ([Figura 13](#)).

Posteriormente, se describió un progenitor que daba lugar a DC convencionales (cDC) y plasmacitoides (pDC), pero no monocitos, tanto *in vitro* (Naik et al., 2006) como *in vivo* (Liu et al., 2009; Onai et al., 2007). Este precursor denominado **CDP** (del inglés *common-DC progenitor*) fue descrito como Lin⁻CD115⁺Flt3⁺CD117^{lo} y se determinó que derivaba de los MDP porque la transferencia adoptiva de los MDP generaba CDP y monocitos. Además con estos

experimentos se demostró que la separación entre monocitos y DC ocurría en la médula ósea en el paso de diferenciación de MDP a CDP (Liu et al., 2009).

Figura I3



Adaptado de Domínguez y Ardavín, 2010

Figura I3. Origen y diferenciación de los monocitos y las DC. Esquema que ilustra el proceso de diferenciación de los monocitos y de las principales subpoblaciones de DCs. Las DCs se diferencian a partir de un precursor común de DCs y macrófagos (MDP) que se encuentra en la médula ósea. El MDP tiene capacidad para generar tanto monocitos Ly-6C^{high} como un precursor común de cDC y pDC (CDP). A su vez el CDP genera pDC y un precursor de cDC (preDC). Por lo tanto, las pDC y los monocitos se diferencian en la médula ósea y desde allí migran, al igual que las preDC, a las distintas localizaciones. Los monocitos Ly-6C^{high} se diferencian localmente en los tejidos o en los órganos linfoides secundarios, generando diferentes tipos de DC y macrófagos. En reposo los monocitos Ly-6C^{high} son capaces de generar macrófagos residentes, células de Langerhans y DC de la *lamina propria*. En situaciones de infección o inflamación los monocitos Ly-6C^{high} se diferencian a moDC inflamatorias, principalmente TipDC, y a macrófagos activados de forma clásica o alternativa. En cuanto a los monocitos Ly-6C^{low} se generan a partir de los monocitos Ly-6C^{high} y dan lugar a DC tolerogénicas o macrófagos anti-inflamatorios. Por último, las preDC se diferencian en los órganos linfoides a DC CD8⁺ y CD8⁻.

Los precursores de las cDC migran desde la médula ósea a los órganos linfoides a través de la sangre, mientras que los MDP y los CDP permanecen en la médula ósea. Una primera aproximación a la identificación del precursor de cDC (**pre-DC**) fue que las células CD11c⁺MHC-II-SIRPα⁺ aisladas a partir de bajas densidades de la sangre, médula ósea y tejidos periféricos tenían la capacidad de generar DC (del Hoyo et al., 2002; Naik et al., 2006); sin embargo, esta población de células era heterogénea y no se pudieron identificar directamente las pre-DC; finalmente la expresión de Flt3 permitió caracterizar inequívocamente la población de precursores de cDC (Liu et al., 2009). En este mismo trabajo se demostró, mediante experimentos de transferencia adoptiva, que las pre-DC aisladas de la médula ósea, la sangre o el bazo generaban DC CD8⁺DEC205⁺ y CD8⁺33D1⁺, siendo también los precursores de las DC residentes en los ganglios linfáticos.

Las pre-DC salen de la médula ósea a la sangre y en menos de 1 hora migran a los ganglios linfáticos, por lo que su identificación en la sangre es muy complicada; sin embargo, el primer precursor con un potencial de diferenciación restringido a linaje de DC (cDC y pDC) fue descrito en la sangre (del Hoyo 2002), siendo su fenotipo muy similar a la población de CDP descrita posteriormente en la médula ósea por el grupo de Nussenzweig (Liu et al., 2009). Las pre-DC entran a los ganglios a través de vénulas de endotelio alto (HEV) por un mecanismo dependiente de la molécula CD62L; parece ser que permanecen asociadas con las HEV durante horas antes de separarse y localizarse en la zona T del ganglio, donde adquieren la morfología con dendritas característica de las DC (Liu et al., 2009). En resumen, los MDP de la médula ósea dan lugar a monocitos y CDP; los CDP generan a su vez pDC y pre-DC, también en la médula ósea; por último, las pre-DC migran desde la médula ósea a la periferia a través de la sangre para generar cDC (Figura I3).

2.2 Subpoblaciones de cDC en homeostasis

Las cDC presentes en estado de reposo se localizan en los órganos linfoides secundarios, es decir, el bazo, los ganglios linfáticos periféricos y los tejidos linfoides asociados al intestino y a los bronquios; además existen cDC en las áreas de captura de antígeno asociadas a las superficies epiteliales, como la piel y las mucosas del tracto digestivo, respiratorio y reproductor (Lopez-Bravo and Ardavin, 2008). Las cDC de los órganos linfoides pueden dividirse en dos categorías: cDC migratorias, presentes en las superficies epiteliales y los ganglios linfáticos, y cDC residentes (Figura I4).

2.2.1 cDC residentes

Las cDC residentes no se ajustan al paradigma de las células de Langerhans, ya que se diferencian dentro de los órganos linfoides a partir de las pre-DC que salen de la médula ósea y llegan al órgano a través de la sangre. Las cDC residentes se pueden clasificar en dos subpoblaciones principales: CD8⁺ DC y CD8⁻ DC; a su vez las CD8⁻ DC pueden dividirse en CD8⁻CD4⁺ DC y CD8⁻CD4⁻ DC (o doble negativas, DN DC) (Villadangos and Schnorrer, 2007).

Hasta el momento no se ha descrito para ninguna de ellas, CD8⁺CD4⁺ DC y CD8⁺CD4⁻ DC, un papel específico en la respuesta inmune frente a patógenos y, por lo tanto, en la mayoría de los casos se consideran estos dos subtipos como una sola población de CD8⁺ DC. Las CD8⁺ DC se localizan principalmente en las áreas T de los órganos linfoides, como son el paracórtex de los ganglios linfáticos periféricos y la zona interna de la pulpa blanca en el bazo. Por su parte, las CD8⁻ DC se encuentran preferentemente en las zonas de captura de antígeno tales como el área localizada bajo el seno subcapsular de los ganglios linfáticos y la zona marginal del bazo (Lopez-Bravo and Ardavin, 2008). Las cDC residentes constituyen la mitad de las DC de los ganglios linfáticos y la mayoría de las DC del bazo y el timo (Kamath et al., 2002).

En ausencia de infección las cDC residentes mantienen un fenotipo inmaduro, por lo que en los ganglios linfáticos se pueden distinguir de las cDC migratorias por su menor expresión en la membrana de MHC-II y de moléculas de coestimulación (Wilson et al., 2003). En presencia de ligandos de TLR (del inglés *Toll-like receptor*), que se definirán más adelante, o de estímulos inflamatorios, las cDC residentes inician el proceso de maduración y participan en la respuesta inmune frente a patógenos que llegan al bazo y a los ganglios linfáticos a través de la sangre o la linfa, o bien que son transportados desde la piel a los ganglios por cDC migratorias. En cuanto a su función durante la respuesta inmune, se ha demostrado que las CD8⁺ DC están especializadas en la cross-presentación, es decir, la presentación a células T CD8⁺ de péptidos derivados de antígenos exógenos en moléculas de MHC-I (Villadangos and Schnorrer, 2007). Además producen IL-12 de forma muy eficiente, ayudando al establecimiento y mantenimiento de respuestas Th1 frente a virus y bacterias (Trinchieri, 2003). Respecto a las CD8⁻ DC, se ha descrito que pueden participar en respuestas Th2 o Th1 (Lopez-Bravo and Ardavin, 2008).

En los órganos no linfoides como la piel, los pulmones, el riñón, el intestino, el SNC y el corazón, existen también cDC residentes. En estos órganos, las DC se pueden clasificar en dos grupos, en base a la expresión de CD103 y CD11b. Por un lado, se encuentran las CD103⁺CD11b^{low} DC, que tienen la capacidad de migrar a los ganglios linfáticos y están especializadas en la cross-presentación de antígenos (Bedoui et al., 2009). Recientemente, se ha propuesto que las CD103⁺ DC periféricas y las CD8⁺ cDC tienen un origen común. Esta hipótesis está basada en estudios con ratones deficientes para el factor de transcripción Batf3 (del inglés *Basic leucine zipper transcription factor*, *ATF-like 3*). Los ratones Batf3 KO tienen un defecto en el desarrollo de las CD8⁺ cDC de los órganos linfoides y carecen de la población CD103⁺CD11b⁻ DC en el pulmón, el intestino, la dermis y los ganglios mesentéricos y peritéricos (Edelson et al., 2010; Hildner et al., 2008). Además se ha demostrado que ambas subpoblaciones derivan del mismo precursor, las pre-DC, que comparten el mismo patrón de expresión génica y que dependen para su desarrollo del factor IRF8 (del inglés *interferon regulatory factor 8*) (Edelson et al., 2010; Ginhoux et al., 2009). La segunda población de DC de los tejidos no linfoides está definida como CD103⁻CD11b⁺ DC. Se trata de una población heterogénea, que depende del receptor de MCSF (MCSF-R o CD115) para su desarrollo. Recientemente, se ha demostrado que una parte de las CD103⁻CD11b⁺ DC de la *lamina propria* del intestino tiene un

origen monocítico (Ginhoux et al., 2009) (Varol et al., 2009).

2.2.2 cDC migratorias

En reposo, las cDC migratorias se diferencian en los tejidos periféricos a partir de un precursor y migran a través de la linfa a los ganglios linfáticos drenantes, donde exhiben un fenotipo maduro en cuanto a la expresión de MHC-II y moléculas de coestimulación; por lo tanto, su ciclo de vida se corresponde con el paradigma de las células de Langerhans (Villadangos and Heath, 2005). En los ganglios linfáticos que drenan la piel las cDC migratorias incluyen a las células de Langerhans (LC) y a las DC dermales, que representan un 35% y un 25% de las cDC del ganglio, respectivamente (Kamath et al., 2002). Se ha demostrado que las LC derivan de monocitos (Ginhoux et al., 2006) y existen evidencias de que las DC dermales se diferencian también a partir de monocitos (Leon and Ardavin, 2008b), aunque esta hipótesis no se ha demostrado de forma concluyente. Las cDC migratorias participan en la defensa frente a patógenos que alcanzan la epidermis o la dermis utilizando mecanismos de invasión de la piel, a través de lesiones o mediante la inoculación por insectos, como en el caso de la malaria o la leishmaniasis.

Figura I4

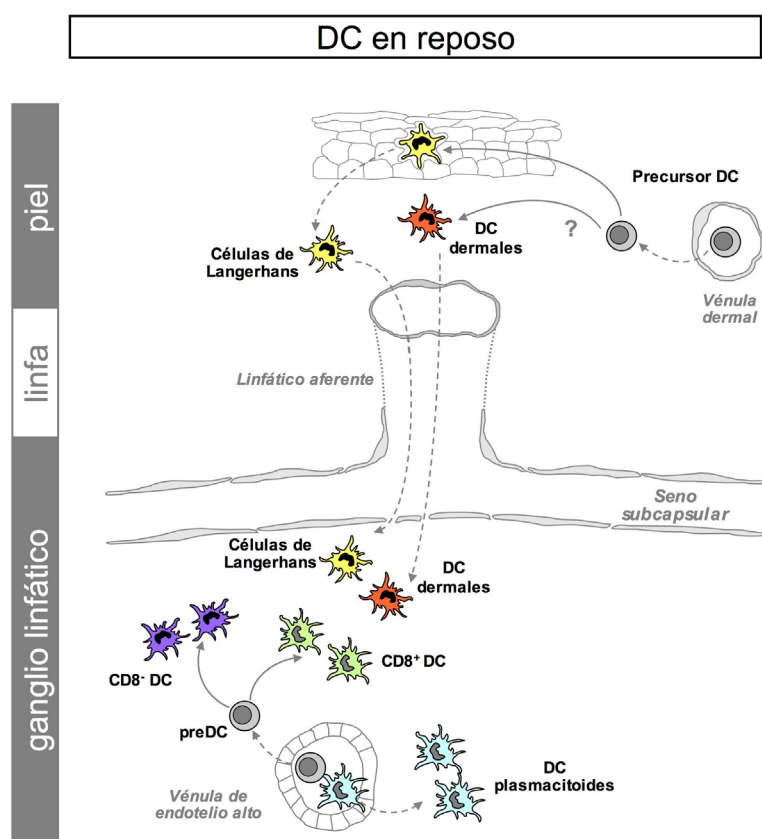


Figura I4. Biología de las DC en reposo.

Esquema que ilustra el reclutamiento y diferenciación de las diferentes poblaciones de DC en la periferia (piel) y en los ganglios linfáticos drenantes en estado de reposo. En ausencia de inflamación, las células de Langerhans (LCs) y las DCs dermales migran de forma constante al ganglio linfático a través de linfáticos aferentes. Asimismo, en el ganglio se encuentran las distintas subpoblaciones de DCs residentes: las pDCs, las cDCs CD8⁺ y las cDCs CD8⁻.

2.3 DC inflamatorias

En situaciones de infecciones agudas o crónicas causadas por virus, bacterias o parásitos se produce un fuerte incremento en el número de DC, tanto en el sitio de la infección como en los órganos linfoides asociados, es decir, el bazo o los ganglios linfáticos (Leon et al., 2007; Martin et al., 2002; Serbina et al., 2003b; Yoneyama et al., 2001). Estas DC inflamatorias derivan mayoritariamente de monocitos que se reclutan al sitio de infección o directamente a los órganos linfoides secundarios (Figura I5). El reclutamiento de los monocitos al sitio de infección se realiza a través de las vénulas dermales por un mecanismo que implica la interacción de PSGL-1 (del inglés *P-selectin glycoprotein ligand-1*) con E-selectina y P-selectina y también la interacción de la L-selectina con PNAd (del inglés *Peripheral lymph node addressin*) (Leon and Ardavin, 2008a). Con respecto al reclutamiento de los monocitos a los órganos linfoides, se ha descrito que se produce a través de las vénulas de endotelio alto mediante la interacción de L-selectina y PNAd (Leon and Ardavin, 2008a). Las moDC dermales inflamatorias y las cDC dermales existentes en reposo presentan un fenotipo muy similar, lo que apoya el origen monocítico de las DC dermales .

Figura I5

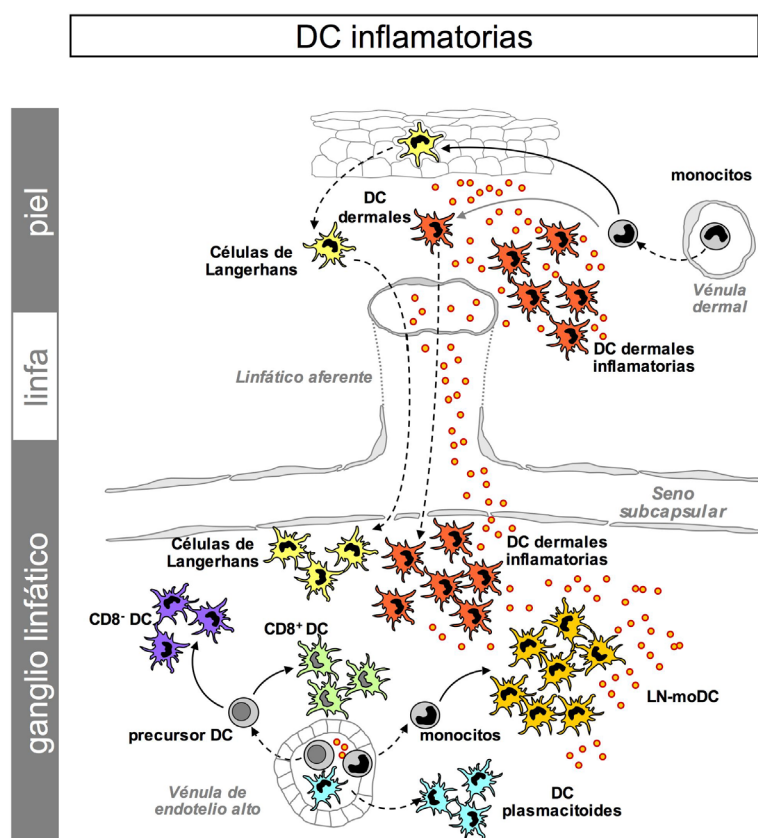


Figura I5. Biología de las DC en inflamación. Esquema que ilustra el reclutamiento y diferenciación de las diferentes poblaciones de DC en la periferia (piel) y en los ganglios linfáticos drenantes en situación de inflamación. Durante un proceso infeccioso en la piel, tanto las LCs como las DCs dermales se van a activar, van a madurar y se va a incrementar la tasa de migración al ganglio. Además en el ganglio se van a reclutar monocitos a través de vénulas de endotelio alto que van a diferenciar DCs inflamatorias (LN-moDC), así como precursores de DC que van a generar CD8⁺ cDC y CD8⁻ cDC.

Por otra parte, se ha demostrado que en situaciones de infección o inflamación se produce un importante aumento de las poblaciones residentes $CD8^+$ y $CD8^-$ cDC, que son fenotípicamente similares a las existentes en reposo (Leon et al., 2007; Martin et al., 2002). Por lo tanto, aunque las DC inflamatorias derivan mayoritariamente de monocitos, existen cDC residentes inflamatorias que se generan *de novo* como consecuencia de la situación inflamatoria (Figura 15).

2.4 Monocitos como precursores de DC y macrófagos

2.4.1 Subpoblaciones de monocitos de ratón

Los monocitos se describieron inicialmente como células con una elevada expresión de las moléculas CD11b, Ly-6C y CD62L, que no expresaban ni CD11c ni MHC-II. Posteriormente, se caracterizó una segunda población de monocitos que expresaba un mayor nivel de CX_3CR1 y un menor nivel de Ly-6C que los monocitos convencionales (Geissmann et al., 2003). Estas dos poblaciones de monocitos se definieron al principio como $Gr-1^{high}$ y $Gr-1^{low}$; sin embargo, actualmente se denominan monocitos $Ly-6C^{high}$ y $Ly-6C^{low}$, debido a que $Gr-1$ se refiere al anticuerpo monoclonal RB6-8C5 que reconoce tanto Ly-6C como Ly-6G, pero los monocitos no expresan Ly-6G, que es un marcador específico de granulocitos (Fleming et al., 1993).

Existen evidencias de que los monocitos $Ly-6C^{low}$ derivan de los $Ly-6C^{high}$ (Sunderkotter et al., 2004; Varol et al., 2006) (Arnold et al., 2007); esta transición parece ocurrir tanto en la médula ósea como extramedularmente, a partir del reclutamiento de monocitos $Ly-6C^{high}$ a los tejidos inflamados (Arnold et al., 2007). Como se ha comentado anteriormente, se considera que los monocitos se diferencian en el interior de la médula ósea a partir del precursor MDP, y que se extravasan desde la sangre a los tejidos para generar macrófagos o DC. Sin embargo, recientemente se ha descrito que existen monocitos $Ly-6C^{high}$ y $Ly-6C^{low}$ en el bazo en estado de reposo (Swirski et al., 2009). Por lo tanto, parece que los monocitos se pueden reclutar no sólo de la médula ósea sino desde el bazo (y posiblemente desde otros órganos) dependiendo de la situación fisiológica y del estímulo que induce su movilización.

2.4.2 Monocitos $Ly-6C^{low}$

Se ha descrito que los monocitos $Ly-6C^{low}$ de ratón tienen la capacidad de generar *in vitro* tanto DC, en presencia de GM-CSF e interleuquina-4 (IL-4) (Geissmann et al., 2003), como macrófagos, en presencia de M-CSF (Swirski et al., 2009). En ausencia de inflamación se ha propuesto que la función de los monocitos $Ly-6C^{low}$ es “patrullar” los tejidos sanos avanzando muy lentamente por el endotelio en reposo (Auffray et al., 2007). Según los autores de este trabajo, en el que utilizan un modelo de infección intraperitoneal con *Listeria monocytogenes*, el objetivo de dicho proceso es la rápida extravasación al sitio de infección de los monocitos $Ly-6C^{low}$ para iniciar la respuesta inmune mediante la producción de $TNF\alpha$ e IL-1. Además proponen que los monocitos $Ly-6C^{low}$ se diferencian posteriormente a macrófagos activados

de forma alternativa. En este mismo sentido, en un modelo de lesión del músculo esquelético, se ha demostrado que los monocitos Ly-6C^{low} se generan a partir de los monocitos Ly-6C^{high} que se reclutan al músculo y se diferencian localmente a macrófagos anti-inflamatorios, que producen TGFβ e IL-10, y que promueven la miogénesis (Arnold et al., 2007). Por último, en un modelo experimental de infarto de miocardio se ha demostrado que los monocitos Ly-6C^{low} se reclutan al miocardio en una fase tardía y producen VEGF (del inglés *vascular endothelial growth factor*), promoviendo la deposición de colágeno, que contribuye a la reparación del miocardio (Nahrendorf et al., 2007).

Por lo tanto, parece que los monocitos Ly-6C^{low} no están implicados en la respuesta inmune innata o adaptativa frente a patógenos sino que tienen un papel como reguladores negativos durante respuestas inflamatorias, generando macrófagos anti-inflamatorios o activados alternativamente, además de participar en la reparación de tejidos.

2.4.3 Monocitos Ly-6C^{high}

2.4.3.1 *Diferenciación a macrófagos*

En situación de reposo, los monocitos dan lugar a la mayoría de las poblaciones de macrófagos, incluyendo aquellos localizados en los órganos linfoides, como los macrófagos de la zona subcapsular de los ganglios linfáticos y los de la zona marginal y de la pulpa roja del bazo. También derivan de monocitos los macrófagos de los tejidos hematopoyéticos (la médula ósea y el timo), así como aquellos presentes en distintos órganos como las células de Kupffer del hígado, los macrófagos alveolares del pulmón y las células de la microglia del sistema nervioso central. Se ha propuesto que en ausencia de inflamación los macrófagos están implicados en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, mediante la eliminación de células apoptóticas y la producción de factores de crecimiento (Geissmann et al., 2010).

En situaciones de inflamación generadas como consecuencia de procesos infecciosos, daño tisular, alergia, autoinmunidad o ciertos tumores, se reclutan monocitos a las zonas inflamadas, donde son activados por factores locales y se diferencian a macrófagos inflamatorios. La función de estos macrófagos va desde la eliminación de células muertas y patógenos a la reparación y reconstrucción de tejidos, aunque también son capaces de regular la respuesta inmune inflamatoria, ya que pueden producir citoquinas proinflamatorias a través de multitud de receptores de reconocimiento de patógenos (Gordon and Taylor, 2005). En la mayoría de los estudios sobre la diferenciación de macrófagos no se caracterizó la subpoblación de monocitos responsable de la generación de los macrófagos, debido principalmente a que se llevaron a cabo anteriormente a la descripción de los monocitos Ly-6C^{low}. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que los monocitos Ly-6C^{high} son los precursores en el cerebro adulto de las células de la microglia que se forman tras las lesiones cerebrales (Mildner et al., 2007) así como de los macrófagos presentes en la placas de ateroma (Swirski et al., 2007).

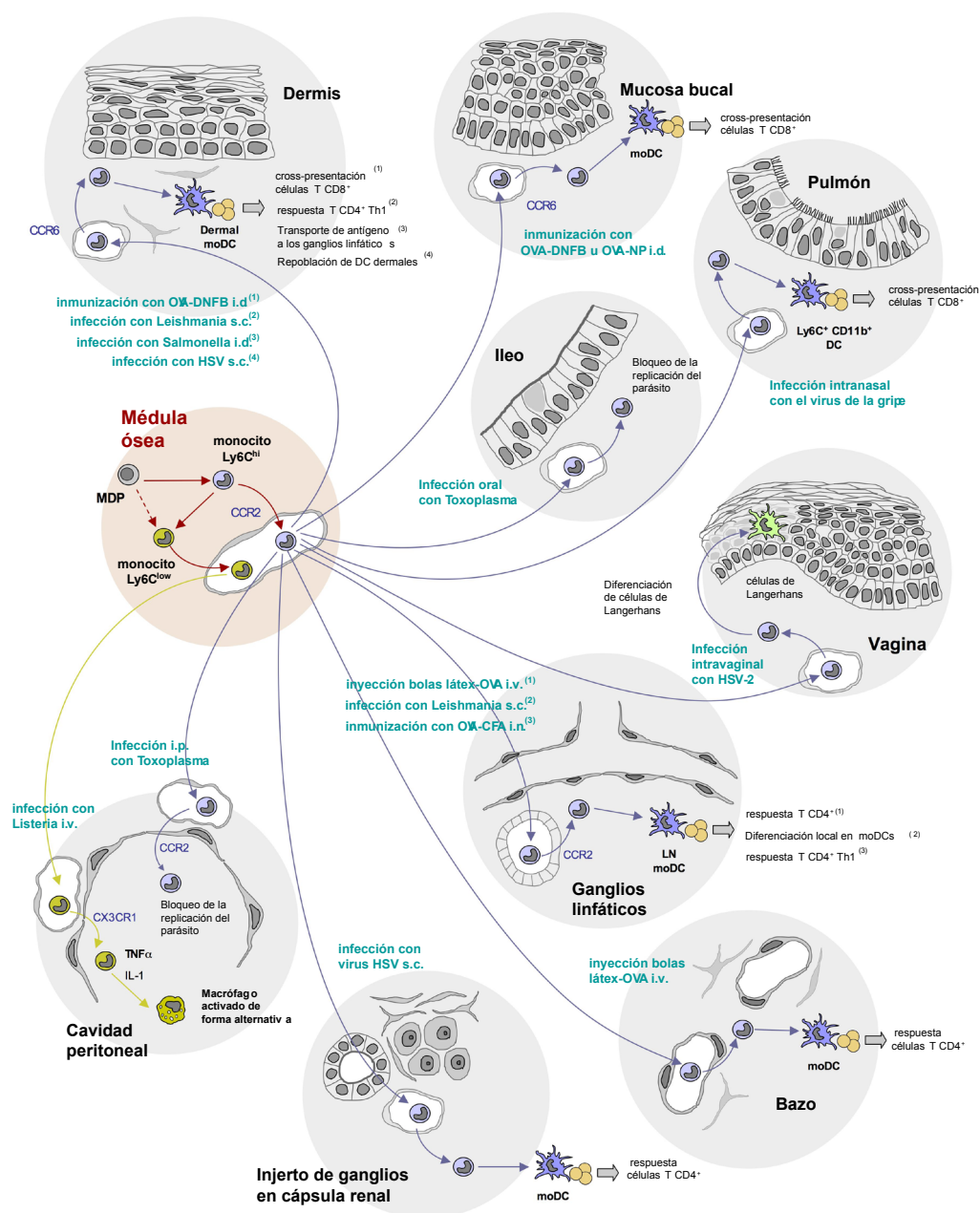
2.4.3.2 Diferenciación a DC

La primera evidencia de la capacidad de los monocitos para generar DC data de 1994; en dicho trabajo se demostró que los monocitos humanos se diferenciaban *in vitro* a DC en presencia de GM-CSF e IL-4 (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). La demostración *in vivo* se produjo posteriormente, en un modelo de ratón basado en la inyección subcutánea de partículas de látex, marcadas con una molécula fluorescente con el fin de trazar las células que las habían internalizado (Randolph et al., 1999); estos autores comprobaron que los monocitos Ly-6C^{high} se reclutaban a la dermis y se diferenciaban localmente a macrófagos y también a DC, para migrar después a los ganglios linfáticos que drenaban la zona de la inyección. La demostración formal de la diferenciación *in vivo* de DC a partir de monocitos en respuesta a la infección por un patógeno se realizó utilizando un modelo de infección subcutánea con *Leishmania major*, mediante la transferencia subcutánea e intravenosa de monocitos (Leon et al., 2007). Se comprobó que durante la infección estos monocitos se reclutaban tanto a la dermis como a los ganglios poplíteos drenantes, generando moDC dermales y LN moDC (del inglés *lymph node DC*), respectivamente. Estas dos poblaciones de moDC eran fenotípicamente similares, aunque las moDC dermales presentaban un fenotipo más maduro (con un mayor nivel de MHC-II, CD86 y CD40 y un menor nivel de Ly-6C) que las LN-moDC, lo que reflejaba su naturaleza migratoria. De hecho, en este trabajo se demostró que las moDC dermales que migraban desde la piel a los ganglios linfáticos eran las responsables de la inducción de la respuesta Th1 de células T CD4⁺ contra *Leishmania*. Con respecto a las LN-moDC, los autores propusieron que participaban en la inmunidad innata frente al parásito; en este sentido, se ha descrito recientemente que durante la infección con *Leishmania major* se diferencian moDC en el ganglio poplíteo, cuya función es producir NO que ayuda a la eliminación de la infección (De Trez et al., 2009); estas moDC probablemente corresponden a las LN moDC.

La diferenciación de monocitos a DC tiene lugar también durante la respuesta inmune asociada a virus. Se ha demostrado que las DC dermales localizadas en las lesiones zosteriformes producidas como consecuencia de la infección con el virus herpes simplex (HSV) migran a los ganglios linfáticos drenantes y son reemplazadas por DC dermales diferenciadas a partir de monocitos Ly-6C^{high} reclutados a la dermis (Eidsmo et al., 2009). Recientemente, se ha descrito que las moDC son capaces de activar células T CD8⁺ de memoria en los tejidos no linfoides; mediante el injerto de células aisladas de ratones infectados con HSV bajo la cápsula renal de ratones no infectados, los autores demostraron que las células T específicas del virus presentes en el injerto eran estimuladas por DC, derivadas de monocitos Ly-6C^{high} reclutados al trasplante (Wakim et al., 2008). Por otra parte, en un modelo de infección pulmonar con el virus de la gripe, se ha descrito que células Ly-6C⁺ CD11b⁺ son capaces de inducir la respuesta de las células T CD8⁺ específicas del virus (Aldridge et al., 2009); estas células son consideradas TipDC, lo que apoya su origen monocítico y su equivalencia con las moDC. Utilizando también el virus de la gripe, pero en un sistema experimental de infección intranasal, se ha descrito que existe un reclutamiento de monocitos Ly-6C^{high} a los ganglios mediastinales, el cual es

dependiente de CCR2 (Nakano et al., 2009); estos monocitos se diferencian en el ganglio a DC que tienen la capacidad de presentar OVA a células T CD4⁺ específicas para OVA (OT-II) y de producir IL-12 *in vitro*, por lo que los autores sugieren que estas LN moDC podrían contribuir a la inducción de respuestas Th1. La información esencial sobre la diferenciación y función de los monocitos Ly-6C^{high} y Ly-6C^{low} en situaciones de infección o tras inmunización está resumida en la [Figura I6](#).

Figura I6



Adaptado de Domínguez y Ardavín, 2010

Figura I6. Diferenciación y función de los monocitos Ly-6C^{high} y Ly-6C^{low} durante respuestas asociadas a una infección o inmunización. Esquema que recoge los datos más relevantes en relación al potencial de diferenciación y la función de los monocitos Ly-6C^{high} y Ly-6C^{low} en modelos experimentales de infección o inmunización. DNFB: 2,4-dinitrofluorobenceno; HSV: virus del herpes simplex; NP: nucleoproteína del virus del sarampión; CFA: adyuvante completo de Freund; i.d.: intradérmico; s.c.: subcutáneo; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenoso.

La generación *in vivo* de DC a partir de monocitos se describió originalmente en situaciones inflamatorias asociadas a procesos infecciosos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los monocitos también son capaces de generar DC en situación de reposo. En concreto, se ha descrito que, tanto en el pulmón como en el intestino, las DC de la *lamina propria* derivan de monocitos Ly-6C^{high} (Varol et al., 2006). Como se ha comentado anteriormente, se ha propuesto que una parte de las CD103⁺ DC de los tejidos no linfoides derivan de monocitos Ly-6C^{high} (Bogunovic et al., 2009; Varol et al., 2009). Además se ha descrito que en los tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT) de los ratones en reposo existe una población de DC derivadas de monocitos, similar a las TipDC (del inglés *TNFα and iNOS-producing DC*) descritas por primera vez en el bazo durante la infección con *Listeria* (Serbina et al., 2003b). Estas TipDC naturales producen TNFα y NO en respuesta a los ligandos de TLR de la flora comensal, es decir, en ausencia de patógenos y además liberan factores que colaboran en el cambio de clase para la producción de inmunoglobulinas de tipo A (IgA) por las células B (Tezuka et al., 2007).

2.4.3.3 TipDC: DC productoras de TNFα y óxido nítrico

Aunque la función principal de las DC es la presentación de antígenos a células T para la inducción de respuestas T antígeno-específicas, en los últimos años se ha descrito una población de DC que participa en la inmunidad innata en vez de la inmunidad adaptativa. Como se ha indicado anteriormente, esta subpoblación fue descrita por primera vez en un modelo de infección con *Listeria monocytogenes*, donde fue definida como TipDC por su capacidad para producir TNFα y NO a través de la inducción de iNOS (Serbina et al., 2003b). La función principal atribuida a las TipDC es la producción de factores solubles con actividad microbicida, aunque también se ha demostrado su implicación en la producción de anticuerpos por las células B (Tezuka et al., 2007). Durante la infección con *Listeria* por vía intravenosa, se produce un importante reclutamiento de monocitos Ly-6C^{high} por un mecanismo dependiente de CCR2, y se generan TipDC en las primeras 24 horas de la infección, las cuales se encargan de eliminar la bacteria (Serbina et al., 2003b). Posteriormente, los mismos autores demostraron que CCR2 estaba implicado en la salida de los monocitos de la médula ósea y no en la entrada de estos monocitos al bazo (Serbina and Pamer, 2006). En este sentido, recientemente se ha descrito que la molécula implicada en el reclutamiento de los monocitos Ly-6C^{high} al bazo durante la infección con *Listeria* es CX₃CR1 (Auffray et al., 2009).

En los últimos años se ha descrito la generación de TipDC en respuesta a diversas infecciones, causadas tanto por bacterias como por parásitos. En un modelo de infección intraperitoneal con *Brucella melitensis* se generan TipDC en el peritoneo y en el bazo (Copin et al., 2007); además durante la infección subcutánea con *Leishmania major* se diferencian TipDC en la dermis y en los ganglios poplíteos drenantes (De Trez et al., 2009). Por otra parte, se ha demostrado que durante la infección intraperitoneal con *Trypanosoma brucei*, se reclutan monocitos Ly-6C^{high} al bazo, al hígado y a los ganglios mesentéricos, que dan lugar a TipDC (Guilliams et al., 2009). Por último, utilizando el modelo de encefalitis autoinmune experimental

(EAE), se ha demostrado que se reclutan monocitos Ly-6C^{high} a la médula espinal, que se diferencian localmente a DC, las cuales son capaces de sintetizar iNOS (King et al., 2009).

Respecto a la diferenciación y activación de las TipDC, se sabe que tanto la producción de TNF como la expresión de iNOS (y la producción de NO) dependen del factor de diferenciación MyD88 (del inglés *myeloid differentiation primary response gene 88*) (Serbina et al., 2003a), así como de las citoquinas IL-12 e IFN γ (De Trez et al., 2009). En este sentido, se ha descrito en el modelo de infección con *Listeria*, que esta bacteria activa las DC del bazo para producir IL-12 e IL-18, las cuales inducen la síntesis de IFN γ por las células NK, que se encuentran formando *clusters* con los monocitos y los granulocitos en el sitio de infección; este IFN γ promueve a su vez la diferenciación de los monocitos Ly-6C^{high} a TipDC (Kang et al., 2008).

2.5 Función efectora de las DC

2.5.1 Reconocimiento de patógenos

El sistema inmune de los vertebrados se puede dividir en dos categorías: inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad adaptativa es resultado de la evolución de los vertebrados y se basa en el reconocimiento de antígenos específicos por parte de los receptores expresados por los linfocitos T y B. Por otra parte, la inmunidad innata está conservada durante la evolución y constituye la primera línea de defensa del organismo frente a los patógenos (Akira et al., 2001). Hasta hace poco se asociaba la inmunidad innata al desarrollo de una respuesta inespecífica, basada en la captura y digestión de los microorganismos por parte de los macrófagos y los neutrófilos. Sin embargo, el descubrimiento del receptor Toll en *Drosophila* revolucionó este concepto; mediante la generación de mutantes con pérdida de función se demostró que existía un receptor específico en *Drosophila* encargado del reconocimiento de la infección causada por hongos (Lemaitre et al., 1996). Posteriormente, se identificaron los genes homólogos de Toll en el sistema humano (hToll) (Medzhitov et al., 1997) y en ratón (Poltorak et al., 1998). El descubrimiento de estos receptores permitió abrir nuevas vías de investigación sobre los mecanismos de reconocimiento de patógenos y la activación del sistema inmune innato, así como sobre la relación entre la inmunidad innata y adaptativa.

Las DC y otras células del organismo expresan receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs), cuya función es reconocer componentes de patógenos (bacterias, virus, parásitos y hongos) tales como lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos, que se han denominado patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La unión de los PAMPs a los PRRs activa vías de señalización intracelular que inducen la síntesis de citoquinas inflamatorias, quimioquinas e interferones (IFNs), así como la maduración de las células. Además, el reconocimiento de los PAMPs por los TLRs tiene lugar en diversos compartimentos celulares como la membrana plasmática, los endosomas, los lisosomas y los endolisosomas (Akira et al., 2006); el objetivo de esta compartimentalización es facilitar la accesibilidad de los ligandos a los receptores TLR. En los mamíferos, la familia de los receptores tipo Toll (TLRs),

expresados en las células presentadoras de antígeno, constituye el principal tipo de PRR, aunque también existen PRRs citosólicos que participan en las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Dentro de este grupo se encuentran los receptores tipo RIG-I (RLRs) y los receptores tipo Nod (NLRs) (Yoneyama and Fujita, 2009).

2.5.1.1 TLRs

Los TLRs son proteínas de membrana de tipo I caracterizadas por un ectodominio compuesto de repeticiones ricas en leucina (LRRs, del inglés *leucine rich repeats*), que son las responsables del reconocimiento de los PAMPs; también tienen un dominio citoplásmico homólogo al del receptor de IL-1, conocido como dominio TIR (del inglés *Toll-IL-1 receptor*), el cual es necesario para iniciar la señalización intracelular. A día de hoy se han identificado 10 TLRs en humanos y 12 TLRs en el ratón; el TLR10 del ratón no es funcional debido a una inserción retroviral y las secuencias codificantes para TLR11, TLR12 y TLR13 se han perdido del genoma humano (Kawai and Akira, 2010). Los TLRs se pueden clasificar en dos grandes grupos en función de su localización celular. El primer grupo está formado por los TLRs expresados en la membrana: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11, que reconocen principalmente componentes de la membrana de los patógenos como lípidos, lipoproteínas y proteínas; el segundo grupo lo componen TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, que se localizan en vesículas dentro de la célula como el retículo endoplásmico (ER), los endosomas, los lisosomas o los endolisosomas y que reconocen ácidos nucleicos de los microorganismos (Kawai and Akira, 2010).

TLRs de membrana

TLR4 fue uno de los primeros receptores identificado dentro de la familia de los TLR; reconoce el lipopolisacárido (LPS) de la membrana de las bacterias Gram-negativas, que puede causar un choque séptico. TLR4 forma un complejo con la molécula MD2 en la superficie de la célula, compuesto de dos subunidades de la asociación TLR4-MD2-LPS, que recluta a las moléculas adaptadoras para iniciar la señalización intracelular (Akashi-Takamura and Miyake, 2008); en la asociación del LPS a TLR4 participan también otras proteínas como CD14 y la proteína de unión a LPS (LBP). Además de LPS, TLR4 está implicado en el reconocimiento de las proteínas de fusión del virus respiratorio sincitial, las proteínas de la envuelta del virus del tumor mamario murino, la neumolisina del *Streptococcus pneumoniae* y la droga derivada de plantas denominada paclitaxel.

TLR2 reconoce una amplia variedad de PAMPs derivados de bacterias, hongos, parásitos y virus, como lipopéptidos bacterianos, peptidoglicano y ácido lipoteicoico de bacterias Gram-positivas, lipoarabinomanano de micobacterias, zymosan proveniente de hongos, mucina de *Trypanosoma cruzi* y la proteína hemaglutinina del virus del sarampión (Akashi-Takamura and Miyake, 2008). Generalmente, TLR2 se encuentra formando heterodímeros con TLR1 o TLR6; el compuesto por TLR2-TLR1 reconoce lipopéptidos triacilados de bacterias Gram-negativas

y micoplasma ((Jin et al., 2007), mientras que el heterodímero TLR2-TLR6 se encarga del reconocimiento de lipopéptidos biacilados de bacterias Gram-positivas y micoplasma (Kang et al., 2009). Además TLR2 puede interactuar con otros coreceptores de la membrana como CD36 (Hoebe et al., 2005) o Dectin-1 (Goodridge and Underhill, 2008). Hasta hace poco tiempo se consideraba que los agonistas de TLR2 inducían la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos y DC, pero no la síntesis de IFN de tipo I; sin embargo, recientemente se ha demostrado que los monocitos inflamatorios son capaces de producir IFN de tipo I en respuesta al virus vaccinia a través de TLR-2 (Barbalat et al., 2009), lo que sugiere que TLR2 podría tener un papel en la respuesta antiviral.

TLR5 se encarga de reconocer la proteína flagelina, que es un componente del flagelo de las bacterias. Se expresa particularmente en las DC CD11c⁺CD11b⁺ de la *lamina propria*, encargadas de inducir la diferenciación de las células Th17 y Th1 en respuesta a flagelina (Uematsu et al., 2008). TLR11 es similar a TLR5 y reconoce la molécula profilina derivada de *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky et al., 2005), así como componentes de las bacterias uropatogénicas (Zhang et al., 2004).

TLRs que reconocen ácidos nucleicos

TLR3 se identificó por su capacidad para reconocer un análogo sintético del RNA de doble cadena (dsRNA) denominado ácido policitidílico-poli-iosínico (Poly(I:C)), que induce una respuesta análoga a la respuesta antiviral mediante la producción de citoquinas proinflamatorias e IFN de tipo I (Kawai and Akira, 2010). Posteriormente, se ha demostrado que TLR3 reconoce además el RNA genómico de los reovirus, y el dsRNA de virus como el virus respiratorio sincitial, el virus West Nile y algunos RNA pequeños interferentes (siRNA) (Akira et al., 2006).

TLR7 fue inicialmente identificado por unirse a derivados de la imidazoquinolina como el imiquimod y el resiquimod (R-848) y análogos de la guanina. Reconoce RNA de cadena sencilla (ssRNA) como el presente en el genoma del virus de la estomatitis vesicular, el virus de la gripe A y el HIV. Se ha demostrado que la producción de citoquinas por las pDC en respuesta a virus RNA es totalmente dependiente de TLR7 (Akira et al., 2006). TLR8 es genéticamente similar a TLR7 y, de hecho, en humanos es TLR8 quien se encarga de reconocer R-848 y ssRNA de virus.

TLR9 reconoce secuencias CpG (citidina-fosfato-guanosina) no metiladas, presentes en el DNA de bacterias y virus, pero poco frecuentes en células de mamífero (Kawai Akira 2010 nat immunol). Los oligodeoxinucleótidos CpG sintéticos funcionan como ligandos de TLR9 activando a DC, macrófagos, células B y células NK e induciendo la síntesis de IFN de tipo I y de citoquinas proinflamatorias como IL-12 (Kawai and Akira, 2010). Se ha descrito que las pDC expresan niveles elevados de TLR9, que utilizan como sensor de infecciones causadas por virus DNA tales como citomegalovirus, HSV-1 y HSV-2.

Señalización intracelular inducida por los TLRs

Todos los TLRs inducen vías que finalizan en la activación del factor nuclear NF- κ B (NF- κ B) y la proteína activadora-1 (AP-1), como se muestra en la [Figura 17](#). NF- κ B es un factor de transcripción dimérico que pertenece a la familia de proteínas con un dominio de homología a Rel: p65/RelA, p50/Nf- κ B1, p52/NF- κ B2, RelB y c-Rel (Karin and Greten, 2005), siendo el heterodímero prototípico el formado por p65 y p50. En células sin estimular NF- κ B se encuentra secuestrado en el citoplasma en forma inactiva interaccionando con el inhibidor de NF- κ B (I κ B). Tras la estimulación de las células a través de ligandos de TLR, I κ B es fosforilada en los residuos serina por un complejo IKK formado por las proteínas quinasas IKK α e IKK β y la proteína reguladora IKK γ /NEMO. La fosforilación de I κ B promueve su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma, permitiendo la liberación de NF- κ B y su translocación al núcleo, donde se une al sitio κ B del DNA (Kawai and Akira, 2006). Por otro lado, AP-1 es una proteína bZIP (del inglés *basic region leucine zipper*) compuesta por miembros de las subfamilias Jun, Fos, factor de transcripción activador (ATF) y Maf, que se une a elementos de respuesta a AMP cíclico (cAMP) (Shaulian and Karin, 2002). La activación de AP-1 inducida por los TLR está mediada por la familia de las MAP quinasas (MAPK), formada por la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), p38 y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK).

El inicio de la señalización por los TLR tiene lugar mediante la interacción heterofílica del dominio TIR del TLR con el dominio TIR de proteínas adaptadoras citosólicas, como MyD88, TIRAP/mal (del inglés *TIR domain-containing adaptor molecule*), TRIF/TICAM1 (del inglés *TIR domain-containing adapter inducing IFNb*) y TRAM/TICAM2 (del inglés *Trif-related adaptor molecule*) (Kawai and Akira, 2010). MyD88 fue la primera proteína de la familia TIR identificada y es utilizada por todos los TLRs, excepto TLR3; induce la activación de NF- κ B y AP-1 para la producción de citoquinas proinflamatorias. TIRAP es la proteína adaptadora que se encarga de reclutar MyD88 a TLR4 y TLR2, promoviendo la unión de proteínas de la familia de las quinasas asociadas al receptor de la IL-1 (IRAK): IRAK1, IRAK2, IRAK4 e IRAK-M (Kawai and Akira, 2006). IRAK4 se fosforila tras ser reclutada al complejo TLR4-TIRAP-MyD88, lo que promueve la activación del factor-6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6), que es un miembro de las ubiquitin-ligasas E3. Por su parte, IRAK1 e IRAK2 se activan secuencialmente, reforzando la activación de NF- κ B y las MAPK. Posteriormente, TRAF6 activa la proteína quinasa 1 activada por TGF β (TAK-1), un componente de la familia de las MAP quinasas quinasas quinasas (MAPKKK). TAK1 forma un complejo con TAB1, TAB2 y TAB3, que se asocia con el complejo IKK para fosforilar IKK β , lo que permite la degradación de I κ B para activar NF- κ B. Simultáneamente, TAK1 fosforila a las MAPK induciendo su activación, lo que conduce finalmente a la activación de AP-1.

La vía dependiente de TRIF se inicia con el reclutamiento de TRIF a la membrana para interaccionar con TLR3 o TLR4 y conduce a la activación de NF- κ B, MAPK y también IRF3, para producir citoquinas proinflamatorias e IFN de tipo I. En el caso de TLR4 se ha descrito que la proteína adaptadora es TRAM (Kawai and Akira, 2010). Se ha demostrado que TRIF

es capaz de reclutar TRAF6 y activar TAK1, promoviendo la translocación al núcleo de NF- κ B (Sato et al., 2003), del mismo modo que en la vía dependiente de MyD88. Además TRIF recluta a la proteína RIP1, que a su vez se une al adaptador TRADD y a la proteína Pellino-1, formando un complejo multimérico que también induce la activación de NF- κ B y las MAPK (Kawai and Akira, 2010). Por otra parte, la señalización mediada por TRIF conduce a la activación del factor IRF3, que induce la transcripción de IFN β . La participación de TRAF3 permite que TRIF active a TBK1 e IKKi, dos proteínas pertenecientes a la subfamilia de las IKK no canónicas, lo que induce la fosforilación de IRF3 y su translocación al núcleo (Hacker et al., 2006).

TLR4 es el único TLR que utiliza las cuatro moléculas adaptadoras y activa las dos vías: la dependiente de MyD88 y la dependiente de TRIF, aunque de una forma secuencial. Inicialmente, TLR4 recluta TIRAP a la membrana plasmática, facilitando la unión de MyD88 que conduce a la activación NF- κ B de y MAPK (Kagan and Medzhitov, 2006). Posteriormente, TLR4 se endocita por un mecanismo dependiente de la proteína dinamina y es transportado a endosomas, donde forma un complejo con TRIF y TRAM iniciando la vía dependiente de TRIF, que conduce a la activación de IRF3, así como a la activación tardía de NF- κ B de y MAPK (Kagan et al., 2008; Tanimura et al., 2008). La correcta producción de citoquinas proinflamatorias inducida por TLR4 requiere de la participación de las dos vías, a diferencia de lo que ocurre con otros TLRs, en los que la activación de la vía dependiente de MyD88 o de la dependiente de TRIF es suficiente para la inducción de citoquinas proinflamatorias.

2.5.1.2 Receptores citoplásmicos que reconocen virus

El sistema inmune es capaz de reconocer PAMPs citoplásmicos a través de RLRs, NLRs y un sensor de DNA de doble cadena (dsDNA) que todavía no ha sido identificado y que induce la producción de IFN de tipo I (Stetson and Medzhitov, 2006). Los RLRs son RNA helicasas que detectan RNA de virus y señalizan a través de IPS-1 (del inglés *interferon promoter stimulator-1*), también conocido como MAVS o Cardif, para inducir respuestas anti-virales. Pertenecen a este grupo: RIG-I (del inglés *retinoic acid inducible gene 1*), Mda5 (del inglés *melanoma differentiation-associated gene 5*) y LPG2 (del inglés *lipophosphoglycan-2*). Por otra parte, la familia de los NLRs está formada por más de 20 miembros que responden a multitud de estímulos, incluyendo PAMPs, partículas no PAMPs y otros factores de estrés celular (Martinon et al., 2009). Entre ellos se encuentran las moléculas Nod1 y Nod2, que reconocen productos procedentes de la degradación o síntesis del peptidoglicano que forma la pared bacteriana (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003). También forma parte de este grupo la molécula NLRP3 (NALP3), que forma el complejo del inflamasoma en respuesta a varios estímulos para activar la producción de IL-1 β e IL-18 por un mecanismo dependiente de la caspasa-1, que genera la forma activa de ambas citoquinas (Agostini et al., 2004).

Figura 17

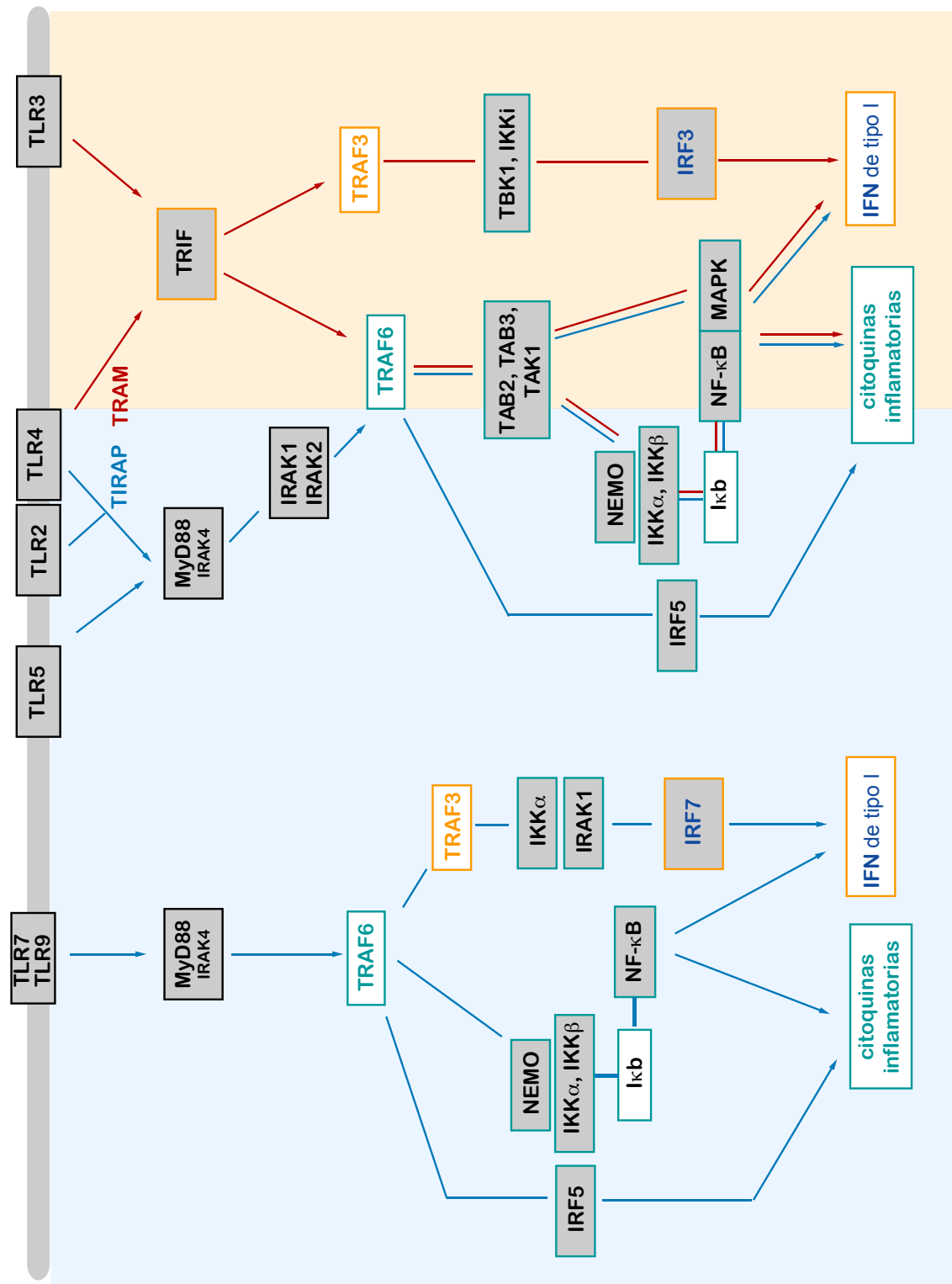


Figura 17. Esquema de la señalización por TLR. Las respuestas mediadas por un receptor de tipo TLR están controladas principalmente por MyD88, molécula que es utilizada por todos los TLR, excepto TLR3. Para TLR3 y TLR4 existe además la vía dependiente de TRIF. TRAM y TIRAP son proteínas adaptadoras utilizadas por TLR4 y TLR2-TLR4, respectivamente. En cDC y macrófagos, MyD88 recluta a IRAK4, IRAK1, IRAK2 y TRAF6 e induce la síntesis de citoquinas proinflamatorias mediante la activación de NF- κ B, MAPK e IRF5. TRAF6 activa a TAK1, que forma un complejo con TAB2 y TAB3, lo que induce por un lado la activación de las MAPK y por otro lado la activación del complejo IKK, que consiste en NEMO e IKK $\alpha\beta$, el cual cataliza la fosforilación de I κ B, que libera NF- κ B para su translocación al núcleo. TRIF también es capaz de reclutar a TRAF6, induciendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Además TRIF recluta a TRAF3, que activa a las quinasas TBK1 e IKKi, que fosforilan a IRF3 induciendo su traslocación al núcleo y la síntesis de IFN de tipo I. En las pDC, TLR7 y TLR9 reclutan a MyD88 junto con IRAK4 y TRAF6, que activa a IRF5 y NF- κ B para inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias y a IRF7 para inducir la transcripción de IFN de tipo I. Para la activación de IRF7 se necesita la participación de las quinasas IKK α e IRAK1, que son activadas por TRAF3.

2.5.2 [Activación de las DC](#)

Las DC tienen un importante papel en la respuesta inmune adaptativa; por un lado, tienen la capacidad de reconocer antígenos y migrar, posibilitando que las células T entren en contacto con antígenos de la periferia. Por otro lado, poseen múltiples receptores (TLR, NLR, RLR) que detectan tanto componentes de los patógenos como mediadores inflamatorios del entorno, lo que les confiere la habilidad de modular el tipo de respuesta de las células T antígeno-específicas. Estas funciones de las DC están ligadas al proceso de maduración, establecido por primera vez a principios de los años 90 por Steinman y colaboradores (Steinman, 1991). Según el concepto clásico de maduración, las DC se pueden encontrar en dos estados: inmaduro y maduro. Las DC inmaduras tienen una alta capacidad fagocítica y expresan niveles bajos de MHC-II y moléculas de coestimulación; se encuentran en la periferia y reciben estímulos de maduración en forma de PAMPs, señales de peligro o citoquinas inflamatorias, que promueven su migración a los órganos linfoides secundarios (Reis e Sousa, 2006). Una vez en dichos órganos las DC alcanzan un estado maduro, caracterizado por una elevada expresión de MHC-II y moléculas de coestimulación y una gran capacidad para producir citoquinas y quimioquinas y presentar antígenos a las células T, iniciando de esta forma la respuesta inmune (Wilson and Villadangos, 2005). Recientemente, se ha demostrado que las DC maduras no siempre son inmunogénicas y que pueden inducir tolerancia. Se ha descrito que tras la exposición a señales inflamatorias en ausencia de patógeno, las DC adquieren un fenotipo maduro, pero son incapaces de inducir la diferenciación de respuestas Th (Sporri and Reis e Sousa, 2005). Asimismo, la presentación de antígenos por DC inmaduras no siempre conduce a la inactivación de la célula T (anergia) y en ocasiones conlleva la inducción de la respuesta inmune. En este sentido, se ha descrito que las células de Langerhans en reposo son capaces de activar células T CD8⁺ que reconocen antígenos propios (Mayerova et al., 2004). Estos resultados han conducido a la re-definición del término maduración, que actualmente se refiere preferentemente a cambios fenotípicos y no está asociado a una determinada capacidad funcional (Villadangos and Schnorrer, 2007).

2.5.3 Inducción de respuestas inmunológicas

La presentación de antígenos por las DC induce la activación de las células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para dichos antígenos, así como la polarización de estas respuestas hacia un perfil Th1, Th2 o Th17, en función del antígeno responsable de la inducción de la respuesta inmune. La defensa frente a patógenos intracelulares, virus y tumores requiere la inducción de respuestas Th1. La producción de IL-12, IL-18 e IFN α por las DC promueve la diferenciación hacia células Th1, que producen IFN γ , el cual tiene un papel fundamental en la activación de las células NK, la producción por las células B de anticuerpos del isotipo IgG2, y la inducción de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL), encargados de la eliminación de las células infectadas o tumorales (Reis e Sousa, 2006). Por otro lado, las DC pueden promover respuestas Th2 (Amsen et al., 2004), en las que las células T producen IL-4, IL-5 e IL-10 e inducen la liberación de IgE, factores que contribuyen a la eliminación de infecciones causadas por parásitos. En este sentido, se ha descrito que diversos estímulos tales como SEA (del inglés *Schistosoma mansoni egg antigen*), omega-1, prostaglandina E o alergenicos como Drp1 pueden condicionar a las DC para inducir respuestas Th2 (Pulendran et al., 2010). Recientemente, se ha propuesto que la respuesta Th2 inducida por el alergeno papaína está mediada por las DC (Tang et al., 2010), aunque hay que señalar que un estudio previo adjudicaba esta función a los basófilos (Sokol et al., 2009). Además las DC están implicadas en la inducción de Treg, que controlan la inflamación mediante la producción de grandes cantidades de IL-10 y TGF β (Mahnke and Enk, 2005) y en las recientemente descritas respuestas Th17 (Veldhoen et al., 2006). En este sentido, se ha propuesto que la señalización a través de Dectin-1 o Dectin-2 conduce a la producción de IL-6 e IL-23 por las DC induciendo la diferenciación de células Th17 (LeibundGut-Landmann et al., 2007; Rogers et al., 2005). Dichas células Th17 están caracterizadas por la producción de citoquinas como IL-17 e IL-22, que estimulan a las células epiteliales para liberar proteínas anti-microbianas, ayudando de este modo a la eliminación de ciertos patógenos como *Candida* y *Staphylococcus* (Bettelli et al., 2007).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo era estudiar el efecto del tratamiento con lovastatina sobre la función de las células dendríticas (DC) inflamatorias generadas durante la respuesta inmune frente a patógenos, las cuales derivan principalmente de monocitos reclutados al sitio de infección y llevan a cabo importantes funciones tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Con este fin, analizamos tanto *in vitro* como *in vivo* la diferenciación en presencia de lovastatina de los monocitos a DC, en base a la respuesta de dichas moDC a la señalización a través de un ligando de TLR. Estudios previos han demostrado que las estatinas modulan la respuesta a LPS de las DC derivadas de médula ósea (BMDC), pero faltaba abordar cuál era el efecto de las estatinas sobre los precursores de las DC inflamatorias, es decir, los monocitos, y cuál era la relevancia fisiológica de la regulación por las estatinas de la activación de las DC inflamatorias. Para llevar a cabo estos objetivos, nos planteamos realizar:

I) el análisis *in vitro* de la función de las moDC diferenciadas en presencia de lovastatina (stat-moDC) utilizando un modelo experimental basado en la diferenciación de DC a partir de monocitos de médula ósea en presencia de GM-CSF y la activación de las moDC con el ligando de TLR4, LPS.

II) la validación *in vivo* de los resultados obtenidos *in vitro* con las stat-moDC estimuladas con LPS. Para ello, utilizamos un modelo de infección con *Listeria monocytogenes* por vía intravenosa en animales tratados previamente con lovastatina por vía intraperitoneal. El objetivo fue estudiar el efecto de la lovastatina sobre la diferenciación *in vivo* de las moDC generadas en el bazo de los ratones infectados con *Listeria*, denominadas TipDC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES BIOLÓGICOS

1.1 Ratones

- Los ratones de la cepa C57BL/6 fueron suministrados por Harlan (Bicester, UK).
- Los ratones de la cepa IFNAR KO en fondo genético C57BL/6 fueron generados por el Dr. Ulrich Kalinke (Centro de Investigación Experimental y Clínica de Infecciones, Hannover, Alemania).

- Los ratones de la cepa C57BL/6 Ly5.1 Pep^{3b} y de la cepa OT-II fueron suministrados por Jakson (Bar Harbor, Maine, EEUU) .

Todos los animales fueron criados bajo condiciones libres de patógenos. Se utilizaron en la experimentación animales de edades comprendidas entre las 8 y las 12 semanas de edad y se respetaron las recomendaciones europeas sobre ética durante los procesos de cría, manipulación y sacrificio.

1.2 Líneas celulares y patógenos

Las líneas celulares de hibridoma utilizadas durante el desarrollo de este trabajo para la producción de anticuerpos monoclonales de ratón (purificados, biotinilados o fluoresceinados) están agrupadas en la [Tabla 1](#).

La línea celular SP20 fue cedida por el Dr. Amigorena, del Instituto Curie, Paris, Francia.

La cepa de *Listeria monocytogenes* 10403S fue proporcionada por el Dr. Thomas Decker de la Universidad de Viena, Austria.

2. REACTIVOS

2.1 Medios de cultivo

Para el cultivo de los hibridomas, así como para los cultivos primarios de monocitos, se utilizó RPMI-1640 suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, L-glutamina 2 µM, 2β-mercaptoetanol 50 µM y sodio piruvato 1mM, todos de Invitrogen (Carlsbad, CA) suplementado con un 10% de suero fetal de ternera (FCS, del inglés, fetal calf serum) de Harlan (Sera-Lab, Reino Unido)

2.2 Anticuerpos monoclonales

Los mAbs utilizados en este trabajo se encuentran listados en la [Tabla 1](#). Algunos mAbs fueron purificados con columnas de proteína G-sefaraosa (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones de la casa comercial, a partir del sobrenadante del cultivo de los hibridomas. El resto de mAbs fueron adquiridos comercialmente en forma purificada o conjugados con biotina, FITC (isotiocinato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (aloficocianina) o PerCP (peridina de clorofila-a).

2.3 Proteínas y péptidos

El péptido ISQAVHAAHAEINEAGR (aminoácidos 323-339; OVA p323-339) derivado de la ovoalbúmina (OVA) de pollo, fue sintetizado en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC (Madrid, España).

La proteína de OVA fue adquirida en Sigma (St Louis, MO).

2.4 Primers para qRT-PCR

Los primers utilizados en este trabajo para el análisis por qRT-PCR (transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) se mandaron sintetizar en Bonsai Technologies (Texas, USA) y Sigma y están especificados en la [Tabla 3](#), junto con su secuencia.

2.5 Estímulos

Para la estimulación de las DCs se utilizaron como estímulos LPS (lipopolisacárido de Escherichia Coli, ligando de TLR4 (Sigma)), CpG 1826 (oligonucleótidos de citosina y guanina, secuencia 5'-tcc atg acg ttc ctg acg tt-3', ligando de TLR9, InVivogen, San Diego, CA) e IFN β recombinante (Sigma).

3. METODOLOGÍA

3.1 Preparaciones celulares

3.1.1 Suspensiones celulares de médula ósea

La obtención de células de médula ósea se realizó a partir del fémur y la tibia, mediante la transferencia de tampón fosfato salino (phosphate-buffered saline, PBS) a través del canal medular. De la suspensión celular obtenida se eliminaron los eritrocitos mediante lisis, durante 30 segundos a temperatura ambiente, con un buffer de lisis eritrocitario compuesto por cloruro amónico (Panreac), después se filtró a través de una malla de 45 μ m, y se lavó dos veces con PBS suplementado con 5 mM EDTA (Panreac, Barcelona, España) y un 3% de FCS.

3.1.2 Suspensiones celulares de bazo

Para la preparación de suspensiones celulares a partir de bazo para el aislamiento de células T, se disgregaron mecánicamente los órganos y se resuspendieron en PBS suplementado con 5 mM EDTA (Panreac) y un 3% de FCS. A continuación se trató dicha suspensión con un tampón de lisis eritrocitaria que contenía cloruro amónico.

La preparación de suspensiones celulares de bazo para la caracterización de las poblaciones presentes, especialmente monocitos y DC, se llevó a cabo cortando los órganos en pequeños trozos para su posterior digestión con 0,5 mg/ml colagenasa A (Roche, Mannheim, Alemania) y 40 mg/ml Dnasa I (Roche) en medio RPMI suplementado con un 3% FCS durante 10 minutos a 37°C. Los fragmentos digeridos se pasaron a través de un filtro de 45 μ m (BD Biosciences, San Diego, CA) y se resuspendieron en PBS con 3% FCS, 5 mM EDTA y 5 mg/ml

DNasa I. A continuación, se trató la suspensión con un tampón de lisis eritrocitaria que contenía cloruro amónico (Panreac). Para el análisis de las poblaciones de monocitos y DC, se deplecionaron las células T y células B, incubando la suspensión primero con mAb anti-CD3 y anti-CD19 y después con esferas magnéticas conjugadas con anti-IgG de rata (Dyna-Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), a una relación esfera:célula de 7:1.

3.2 Aislamiento de poblaciones celulares

3.2.1 Aislamiento de monocitos

Los monocitos fueron aislados mediante selección negativa a partir de suspensiones celulares de médula ósea tratadas con tampón de lisis eritrocitaria; se deplecionaron las células T, células B, DC, granulocitos y células NK utilizando esferas magnéticas conjugadas con anti-IgG de rata (Dyna-Invitrogen), a una relación esfera:célula de 7:1, después de la incubación con mAbs anti-CD90.2, B220, MHC-II, CD43 y CD24. Después de la depleción inmunomagnética, las preparaciones tenían una pureza superior al 95%.

3.2.2 Aislamiento de DC de los cultivos de moDC

Se purificaron por selección positiva las moDC diferenciadas a partir de monocitos utilizando métodos inmunomagnéticos, mediante la incubación secuencial con mAb anti-CD11c conjugado con biotina y microesferas conjugadas con estrepto-avidina (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

3.2.3 Aislamiento de las poblaciones de los cultivos de Flt3-L

Las pDC (células B220⁺) se aislaron de los cultivos de Flt3-L a día 7, tras la depleción de las células B presentes en el cultivo; para ello, se incubaron las células con mAb anti-CD19 conjugado con biotina y se seleccionaron las células B por métodos magnéticos mediante incubación con estrepto-avidina MACS. A continuación se aislaron las pDC por selección positiva incubando secuencialmente la fracción no retenida con mAb anti-B220 biotinilado y estrepto-avidina MACS.

3.2.4 Aislamiento de linfocitos T CD4⁺

Las células T CD4⁺ se purificaron mediante selección negativa a partir de suspensiones de bazo, incubando primero las células con mAb anti-B220, CD24, CD11b, CD8, Gr-1, F4/80, MHC-II, CD49b y CD25 conjugados con biotina y, posteriormente, con estrepto-avidina MACS. La pureza obtenida tras la depleción magnética era superior al 95%.

3.2.5 Aislamiento de neutrófilos y mielocitos

Se purificaron los neutrófilos y mielocitos por selección positiva a partir de suspensiones celulares de bazo; tras el tratamiento con colagenasa y DNasa de los órganos, se incubaron las células con mAb Ly-6G biotinilado y estrepto-avidina MACS y se llevó a cabo la separación magnética. Las preparaciones presentaban una pureza superior al 90%.

Tabla 1

Citometría de flujo/aislamiento de poblaciones celulares		
Especificidad	Molécula conjugada	Clon
CD3	purificado	KT3
CD4	PE/PerCP	GK1.5
CD8 α	biotina/PE	53-6.72
CD11b	biotina/FITC/PE	M1/70
CD11c	biotina	N418
CD11c	APC	HL3
CD16/32 (Fc γ RII/III)	purificado	2.4G2
CD19	purificado	1D3
CD24	purificado/biotina	M1/69
CD25	biotina/PE	3C7
CD40	biotina	FGK45
CD43	purificado	S7
CD45.2 (Ly5.2)	biotina	ALI-4 ^a 2
CD45RA (B220)	biotina/FITC	RA3-6B2
CD49b	biotina/PE	DX5
CD62L	APC	MEL-14
CD69	biotina	H.1.2F3
CD86	biotina	GL-1
CD90.2 (Thy1.2)	APC	AT15
F4/80	biotina	31-A3-1
Gr1	biotina	RB6-8C5
Ly-6C	biotina/FITC	HK1.4
Ly-6G	biotina/PE	1A8
MHC-II	purificado/biotina	FD11-54.3
MHC-II	FITC	2G9

Tabla 1. Listado de mAb utilizados para citometría de flujo y aislamiento de poblaciones celulares. Se especifica para cada anticuerpo el clon/es utilizado y la molécula/s con la que se ha conjugado: biotina o uno de los siguientes fluorocromos: APC: alofococianina; FITC: isotiacianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP: peridina de clorofila a.

3.3 Cultivos celulares

3.3.1 Diferenciación y activación de DC derivadas de monocitos

Los monocitos aislados a partir de médula ósea de ratón se pusieron en cultivo durante 48 horas, en placas de 24 pocillos, a una concentración de $0,25 \times 10^6$ células/ml, en medio RPMI en presencia de 20 ng/ml del factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, del inglés *macrophage and granulocyte colony stimulating factor*, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y 1 μ M de lovastatina (Mevinolina; Sigma).

Las moDC resultantes de la diferenciación de los monocitos se activaron a distintos tiempos con 4 μ g/ml LPS, para su posterior análisis por citometría de flujo, western-blot y microscopía confocal. Además se recogió el sobrenadante de dichos cultivos estimulados durante 16 horas con LPS para determinar la producción de citoquinas por ELISA (BD Pharmingen, San Diego, CA).

3.3.2 Diferenciación y activación de DC generadas en presencia de Flt3-L a partir de médula ósea de ratón

Las suspensiones de médula ósea total obtenidas tras la lisis de los eritrocitos se pusieron en cultivo durante 7 días en placas de 24 pocillos, a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml, en medio RPMI en presencia de un 15% del sobrenadante de la línea celular SP20 (productora de Flt3-L). Transcurridos los 7 días, se aislaron por métodos inmunomagnéticos las pDC (células B220⁺) y se activaron durante 16 horas con 6 µg/ml de CpG 1826.

3.3.3 Infección *in vitro* de moDC con *Listeria monocytogenes*

La bacteria *Listeria monocytogenes* de la cepa 10403S se creció en medio BHI (del inglés *Brain Heart Infusion*; BD Difco) a 37°C con agitación; al día siguiente, se reinició el cultivo partiendo de una dilución 1:20 e incubando con agitación hasta obtener una densidad óptica $OD_{600}=0,3-0,5$, que corresponde a una concentración de 5×10^8 bacterias/ml.

La infección de las moDC con *Listeria* se llevó a cabo en placas de 24 pocillos en medio RPMI sin antibióticos, a distintas multiplicidades de infección (MOI) bacteria:célula, durante 1 y 4 horas. Después de la infección, se trataron las moDC con 50 µg/ml gentamicina durante 1 hora para eliminar la bacteria extracelular; posteriormente, se añadió al cultivo medio nuevo con 10 µg/ml gentamicina y se mantuvo durante 16 horas más con el fin de analizar el fenotipo y la producción de citoquinas.

3.3.4 Ensayo de presentación *in vitro* de células T específicas para OVA

Para el ensayo de activación *in vitro* de células T, se aislaron células T OT-II CD4⁺ del bazo y se pusieron en cultivo con moDC diferenciadas en presencia o ausencia de lovastatina, estimuladas con LPS y pulsadas con 20 µg/ml del péptido de OT-II p323-339 durante 1 hora; el co-cultivo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo redondo, con 10^5 células/pocillo en una relación célula T:DC 10:1. Transcurridas 72 horas, se analizó el fenotipo de las células T por citometría de flujo, así como la producción de citoquinas por ELISA. La proliferación de las células T fue analizada mediante la incorporación de timidina tritiada ([³H]- timidina) en un pulso de 12 horas (1µCi/pocillo).

3.4 Microscopía confocal

Se realizó el análisis por inmunofluorescencia de moDC diferenciadas sobre cubres de 12 mm en placas de 24 pocillos; tras la estimulación de las moDC con LPS durante 6 o 16 horas, se tomaron los cristales y se llevó a cabo el marcaje en una cámara húmeda. En primer lugar se lavaron las preparaciones con TBS y se fijaron con formaldehído (Merck) al 2% en TBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron los cristales con TBS y se permeabilizaron las células incubando durante 1 minuto con Tritón X-100 (Sigma) al 1% en TBS a temperatura ambiente. A continuación se lavaron los cristales con TBS y se bloquearon las células con TNB (BSA al 2% y Tritón X-100 al 0,2% en 100 mM Tris/HCl y 150 mM de NaCl), incubando durante 30 minutos a 37°C. En esta misma solución de bloqueo se

prepararon los anticuerpos contra las moléculas de interés. Se incubaron las preparaciones durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, en este caso anti-p65 o anti-Nrf2; después se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rabbit biotinilado (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y, por último, se incubaron con neutravidina conjugada con Alexa Fluor-488 (Molecular Probes, Eugene, OR). Para el marcaje de los núcleos se utilizó el colorante fluorescente DAPI, que se une al DNA, incubando las preparaciones durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se montaron los cristales sobre portas utilizando Mowiol, dejando secar las muestras durante toda la noche a 37°C. Las células se analizaron utilizando un microscopio confocal Olympus IX81.

El análisis de la organización del citoesqueleto de actina se llevó a cabo en citocentrifugaciones (CTC) de co-cultivos de moDC con células T OT-II. Las CTCs se realizaron centrifugando las células sobre un porta en una centrífuga cytospin a una velocidad de 600 rpm durante 10 minutos; las muestras se dejaron secar durante 16 horas antes de realizar el marcaje. Para analizar la actina se incubaron las preparaciones con mAb anti-faloidina conjugado con Alexa 488 durante 30 minutos en TNB a temperatura ambiente y se montaron con Mowiol, para su posterior análisis por microscopía confocal.

La lista completa de los anticuerpos para microscopía confocal utilizados en este trabajo se encuentra recogida en la [Tabla 2](#).

3.5 Western Blot

El análisis de la expresión de proteínas se realizó a partir de extractos totales de células, preparados mediante el raspado en el pocillo de las moDC en 50 µl del buffer de lisis RIPA SCBT (PBS, NP40 1%, sodio deoxicolato 0,5% y SDS 0,1%) al que se añadieron en el momento 1 mM PMSF (Sigma) y 10 µl del cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma). El buffer de lisis se dejó actuar durante 15 minutos en hielo y después se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Por último, se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) midiendo la absorbancia a 550nm en un espectrofotómetro. Una vez determinada la cantidad de proteína en los extractos totales, se añadió el buffer de carga y se hirvió durante 5 minutos a 99°C para desnaturalizar las proteínas.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 8% y se dejaron correr las muestras a 100V durante 90 minutos a temperatura ambiente. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) por el método de transferencia húmeda a 100V durante 1 hora a 4°C. Después se bloquearon las uniones inespecíficas incubando las membranas durante 1 hora con 5% de leche en polvo sin grasas en TBST (del inglés, Tris Buffered Saline Tween-20, 150mM NaCl, 20mM Tris-Hcl pH7.5 y 0,05% Tween-20).

Una vez realizado el bloqueo, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios listados en la [Tabla 2](#), diluidos en 5% de leche o BSA (Sigma) en TBST según las recomenda-

ciones de la casa comercial. Las incubaciones de los anticuerpos primarios se llevaron a cabo a 4°C durante 16 horas en agitación, mientras que los anticuerpos secundarios anti-rabbi o anti-mouse conjugados con HRP (del inglés *horse radish peroxidase*) se incubaron en 5% leche en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Después de lavar las membranas con TBST 3 veces durante 5-10 minutos en agitación, se revelaron con el reactivo ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Bioscience Europe GmbH, Friedburg, Alemania) incubando durante 3 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Las bandas resultantes fueron escaneadas y, posteriormente, cuantificadas utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, San Diego, CA).

Tabla 2

Microscopía confocal / Western blot		
Especificidad	Número de catálogo	Procedencia
HO-1	sc-10798	Santa Cruz Biotechnology Inc.
iNOS	2982	Cell Signaling Technology
Nrf-2	sc-722	Santa Cruz Biotechnology Inc.
p38	2371	Cell Signaling Technology
p-p38	9215	Cell Signaling Technology
p-65	sc-372	Santa Cruz Biotechnology Inc.
STAT-1	9172	Cell Signaling Technology
p-STAT-1	9167	Cell Signaling Technology
β-actina	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology Inc.

Tabla 2. Listado de mAb utilizados para western-blot y microscopía confocal. Se especifica el número de catálogo de cada anticuerpo y la casa comercial encargada de suministrarlos.

3.6 Tinción GIEMSA

Se analizó la morfología de los neutrófilos y mielocitos realizando una tinción Giemsa sobre cytopins de las células Ly-6G⁺ aisladas de bazo mediante selección positiva por métodos inmunomagnéticos. Las preparaciones se incubaron durante 4 minutos con Giemsa concentrado (Sigma) y, posteriormente, se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante; por último, se dejaron secar completamente antes de su análisis bajo un microscopio óptico.

3.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

La cuantificación del mRNA se realizó por qRT-PCR (del inglés *quantitative real time polymerase chain reaction*). En primer lugar se aisló el mRNA a partir de pellets congelados a -80°C de moDC o pDC que habían sido centrifugadas a 1500 rcf durante 5 minutos a 4°C. Tras la lisis de dichos pellets, la extracción de mRNA se llevó a cabo con el kit RNAqueous-Microkit de Ambion Inc (Austin, TX) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Una vez extraído el RNA, se cuantificó la cantidad de mRNA utilizando un Nanodrop, Thermo (Wilmington, USA) y se sintetizó el cDNA correspondiente con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Se utilizó un termociclador geneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) para la retrotranscripción mediante el siguiente programa: 1 ciclo de 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C.

Por último, se amplificó el cDNA obtenido utilizando el reactivo FluoCycle SYBR Green mix (Euroclone, Milán, Italia) mediante un termociclador ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems). La secuencia de los primers utilizados en este trabajo están listados en la [Tabla 3](#).

Tabla 3

Gen	Secuencia
IL-1b	5' TGG TGT GTG ACG TTC CCA TT 3'
	5' CAG CAC GAG GCT TTT TTG TTG 3'
IL-6	5' GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC 3'
	5' AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA 3'
IL-12 p35	5' CCA CCC TTG CCC TCC TAA A 3'
	5' GGC AGC TCC CTC TTG TTG TG 3'
IL-12 p40	5' GGA AGC ACG GCA GCA GAA TA 3'
	5' AAC TTG AGG GAG AAG TAG GAA TGG 3'
IFNb	5' TCA GAA TGA GTG GTG GTT GC 3'
	5' GAC CTT TCA AAT GCA GTA GAT TCA 3'
IRF-1	5' CAG GGC TGA GCT GGA TCA AT 3'
	5' CGG AAC AGA CAG GCA TCC TT 3'
b-actina	5' GGC TCC TAG CAC CAT GAA GA 3'
	5' CCA CCG ATC CAC ACA GAG TA 3'

Tabla 3. Listado de los primers utilizados para qRT-PCR. Para cada gen se especifican las secuencias forward y reverse de cada uno de los primers utilizados para qRT-PCR.

3.8 Producción de citoquinas

La cuantificación de citoquinas se llevó a cabo por el método de ELISA (del inglés Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) en el sobrenadante de los cultivos de moDC estimuladas con LPS durante 16 horas. Se analizaron las citoquinas proinflamatorias IL-1β, IL-6 e IL-12 p70, así como IL-10, utilizando los kits comerciales BD OptEIA (BD Biosciences). Para la detección de IFNβ en los sobrenadantes se utilizó el kit de PBL (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ). También se determinó por ELISA la concentración de IL-2 e IFNγ en el sobrenadante de los co-cultivos a 72 horas de moDC y células T OT-II, utilizando los kit BD OptEIA (BD Biosciences).

El óxido nítrico (NO) producido por las moDC estimuladas con LPS durante 16 horas se cuantificó mediante una variante del método de Griess, calculando por métodos colorimétricos la concentración de nitritos en el sobrenadante de los cultivos con el kit Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Fluka, Buchs, Suiza).

3.9 Ensayos *in vivo*

3.9.1 Ensayo de presentación *in vivo* de células T específicas para OVA

Para el ensayo de activación *in vivo* de células T, se aislaron células T OT-II CD4⁺ del bazo y se marcaron con el colorante fluorescente CFSE (del inglés, Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) para analizar posteriormente su proliferación. Se inyectaron 5×10^6 células T OT-II por vía intravenosa en la base de la cola de ratones C57BL/6 Ly5.1 Pep^{3b}, en un volumen de 200 μ l de PBS. Al día siguiente, se inyectaron subcutáneamente en la almohadilla plantar trasera de esos mismos ratones $0,5-1 \times 10^6$ de moDC resuspendidas en 50 μ l de PBS; dichas moDC habían sido estimuladas previamente con LPS y pulsadas con 1 mg/ml de la proteína OVA (Sigma) durante 2 horas. A los 3 días se extrajo el ganglio poplíteo drenante y se analizó el fenotipo y la proliferación de las células T OT-II por citometría de flujo.

3.9.2 Infección *in vivo* con *Listeria monocytogenes*

La bacteria *Listeria monocytogenes* 10403S se creció en medio BHI a 37°C sin agitación; al día siguiente, se determinó la concentración del cultivo midiendo la absorbancia a 600nm; típicamente, después de 16 horas el cultivo alcanzaba la fase estacionaria con una $OD_{600} \approx 1$, que correspondía a 10^9 bacterias/ml. Se centrifugaron las bacterias a 12000 rpm durante 12 minutos a 4°C y se resuspendieron en PBS; a continuación se prepararon diluciones seriadas a partir del cultivo inicial para inyectar 3×10^3 CFU por vía intravenosa en la base de la cola del ratón, en un volumen de 200 μ l de PBS.

Para analizar el efecto de la lovastatina en la función de las moDC *in vivo* durante la infección con *Listeria*, se trataron previamente los ratones durante una semana, inyectando diariamente por vía intraperitoneal 200 μ g de lovastatina en un volumen de 200 μ l de PBS; a los ratones control se les inyectó solamente PBS.

3.10 Análisis de la carga bacteriana

Se extrajo el bazo de los ratones infectados con *Listeria*, se troceó y se procesaron los fragmentos con collagenasa y DNasa durante 10 minutos a 37°C, como se ha descrito anteriormente, resuspendiendo el órgano en 10 ml de RPMI 3% FCS. Se tomó 1 ml de dicha suspensión y se realizaron diluciones seriadas en PBS (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) en tubos de 1,5 ml; se plaquearon 100 μ l de cada dilución en placas de BHI agar, extendiendo el volumen con un asa de vidrio, y se dejaron crecer las bacterias durante toda la noche a 37°C con la placa en posición invertida. Al día siguiente, se contaron las colonias presentes en cada placa y se realizó el cálculo de las CFU (unidades formadoras de colonias) en el órgano inicial en función de la dilución.

3.11 Citometría de flujo

Las tinciones se realizaron incubando primero con los mAb biotinilados diluidos en PBS 5 mM EDTA suplementado con un 3% FCS, en un volumen de 30 μ l por cada 10^6 células, durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad. Posteriormente, se incubaron las células con otra de capa de anticuerpos conjugados directamente con diferentes fluorocromos (FITC, PE y APC) junto con la estreptoavidina conjugada con PerCP, que se une a los anticuerpos biotinilados; esta incubación se realizó en el mismo tampón durante 15 minutos a 4°C y en oscuridad.

En todas las tinciones se bloquearon previamente los receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas (FcR) con mAb purificados anti-Fc γ RII/III.

3.11.1 Caracterización de monocitos aislados de médula ósea

Los monocitos aislados de médula ósea se analizaron en base al doble marcaje con mAb anti-Ly-6C-FITC y anti-CD11b-PE, después de cada proceso de aislamiento.

3.11.2 Caracterización de las DC derivadas de monocitos (moDC)

Las moDC diferenciadas a partir de monocitos fueron definidas a través del doble marcaje con mAb anti-CD11c-APC y anti-MHC-II-FITC. La caracterización de las moDC se llevó a cabo utilizando anticuerpos biotinilados anti-CD11b, F4/80, CD86, CD40 o CD69, que fueron revelados con estreptoavidina-PerCP (BD Pharmingen).

3.11.3 Caracterización de las DC diferenciadas en presencia de Flt3-L (FL-DC)

Los cultivos de DC diferenciadas a partir de médula ósea total en presencia de Flt3-L se analizaron a día 7 en base al triple marcaje con B220-FITC, CD11b-PE y CD11c-APC, que permitía la identificación de las 3 poblaciones de DC presentes en dichos cultivos: pDC, CD8⁺cDC y CD8⁻cDC.

3.11.4 Caracterización de las células T OT-II activadas *in vitro*

Las células T OT-II activadas *in vitro* con moDC se identificaron utilizando CD4-PerCP y se analizaron en base a CD25-PE y CD62L-APC.

3.11.5 Caracterización de las células T OT-II activadas *in vivo*

La proliferación de las células T OT-II en el ensayo de activación *in vivo* de linfocitos T con moDC se analizó en base a los niveles de CFSE. Se aislaron las células T CD4⁺ del bazo de ratones OT-II y se incubaron con 5 μ M CFSE en RPMI suplementado con 1% FCS, durante 20 minutos a 37°C; se lavaron las células 2 veces y se analizó por citometría de flujo el nivel de CFSE de partida, antes de la inyección intravenosa en ratones C57BL/6 Ly5.1 Pep^{3b}; además se determinó la pureza del aislamiento con el mAb CD4-PE.

Se identificaron en el ganglio poplíteo las células T OT-II inyectadas mediante la expresión de CD45.2 conjugado con biotina, que se reveló con estreptoavidina-PerCP; y, posteriormente, se analizó el fenotipo de dichas células T con CD25-PE y también la proliferación correlacionando los picos de CFSE con el número de divisiones celulares.

3.11.6 Marcaje intracelular

Para la detección de iNOS se llevó a cabo un marcaje intracelular. En primer lugar, se realizó la tinción en superficie de las moléculas expresadas en la membrana, de la forma descrita anteriormente, pero con los anticuerpos al doble de concentración. A continuación se fijaron las células con paraformaldehído (Panreac) al 4% en PBS, en un volumen de 50 μ l durante 10 minutos a 4°C. Después de lavar las células, se realizó el marcaje intracelular compuesto de tres capas: anti-iNOS (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), seguido de goat anti-rabbit biotinilado (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y estreptoavidina-PerCP. Los 3 anticuerpos se diluyeron en PBS suplementado con 0,3% saponina (Sigma) para permeabilizar las células, y 0,5% BSA (Sigma) para bloquear las uniones inespecíficas; las incubaciones se llevaron a cabo durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

3.11.7 Detección de especies reactivas de oxígeno

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por las moDC se cuantificó en base a la fluorescencia de las células tras la incubación con 1 μ M de la sonda fluorescente CM-H₂DCFDA (Molecular Probes, Eugen,OR), durante 20 minutos a 37°C en PBS.

3.11.8 Análisis de las subpoblaciones celulares en el bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes*

Se analizaron las poblaciones presentes en el bazo durante la infección con *Listeria* a partir de suspensiones celulares de bazo procesado con colagenasa y DNasa. Se identificaron las células T con anti-CD90.2-APC, CD4-APC y CD8 α biotinilado seguido de estreptoavidina-PerCP; para las células B se utilizó B220-FITC, mientras que las células NK se identificaron con CD49b-biotinilado y estreptoavidina-PerCP.

El análisis fenotípico de los monocitos y las DC se llevó a cabo a partir de suspensiones celulares de bazo tras la depleción inmunomagnética de las células T y B; se realizó un triple marcaje con CD11b-FITC, CD11c-APC y CD49b y Ly-6G ambos conjugados con PE, con el objetivo de excluir las células NK y los granulocitos, respectivamente.

La caracterización de los neutrófilos y los mielocitos se realizó partiendo de suspensiones de bazo deplecionadas de células T y células B, mediante un doble marcaje con Ly-6G-PE y F4/80 o Ly-6C biotinilado seguido de estreptoavidina-PerCP.

El análisis de las tinciones de citometría de flujo fue realizado en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences), usando el software CELL Quest (BD Biosciences).

RESULTADOS

Diferenciación de moDC en presencia de lovastatina

El modelo experimental utilizado en este estudio está basado en la diferenciación *in vitro* de monocitos de médula ósea en presencia de la citoquina GM-CSF. Para el establecimiento de estos cultivos se aislaron los monocitos de la médula ósea de ratones C57/BL6 mediante selección negativa, según se describe en Material y Métodos, obteniéndose una población con una pureza superior al 90% (Figura R1). El cultivo de los monocitos durante 48 horas en presencia de GM-CSF generó una población de moDC (definidas como células CD11c⁺ MHC-II⁺), que constituía más del 80% de las células del cultivo y que denominamos moDC control (C-moDC) (Figura R2A-B).

Figura R1

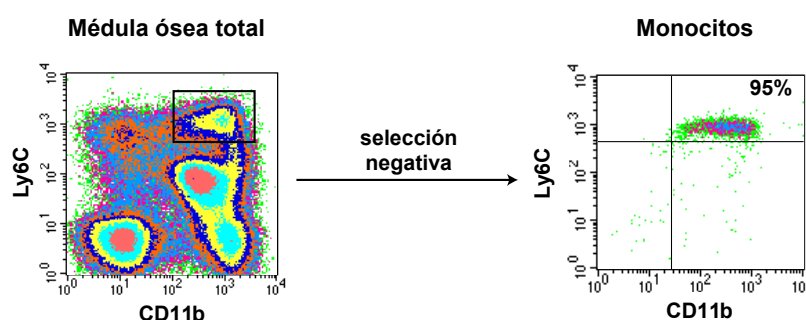


Figura R1. Aislamiento de monocitos de médula ósea. Caracterización de la población de monocitos de médula ósea total en base a la expresión de Ly6C y CD11b (panel izquierdo). Asimismo se muestra la población de monocitos resultante del aislamiento por selección negativa (panel derecho).

Para analizar el efecto del tratamiento con lovastatina sobre la diferenciación de monocitos a células dendríticas, se cultivaron monocitos en presencia de GM-CSF y de lovastatina a una concentración de 1 μ M, obteniéndose una población de células dendríticas que denominamos stat-moDC. La concentración de lovastatina utilizada en este trabajo se basó en experimentos de titulación, en los cuales se analizó el efecto de cantidades crecientes de esta droga sobre la viabilidad celular en cultivos de moDC a 48 horas. Como se observa en la Figura R2B, concentraciones superiores a 1 μ M causaban un importante descenso en la viabilidad celular, aunque la diferenciación de los monocitos a células dendríticas no se veía afectada.

Este resultado indica que los monocitos son muy sensibles a la lovastatina, a diferencia de lo descrito para otros tipos celulares, como células endoteliales (Kou et al., 2009) o células musculares (Sindermann et al., 2000). En dichos estudios no se observaba pérdida de viabilidad incluso a una concentración de estatina de 10 μ M, es decir, diez veces mayor a la utilizada en este trabajo. Del mismo modo, se ha descrito que células dendríticas derivadas de médula

ósea (BMDC, del inglés *bone marrow-derived DC*) de ratón son viables a una concentración de 10 μ M (Sun and Fernandes, 2003). En base a estas observaciones, se analizó la viabilidad de moDC activadas con LPS y tratadas al mismo tiempo con diferentes concentraciones de lovastatina (Figura R2C-D). Como nuestros resultados confirman, el tratamiento con lovastatina a una concentración de 10 μ M en moDC ya diferenciadas no afectaba ni a su viabilidad celular ni a su capacidad de producir IL-12 tras la activación con LPS.

Figura R2

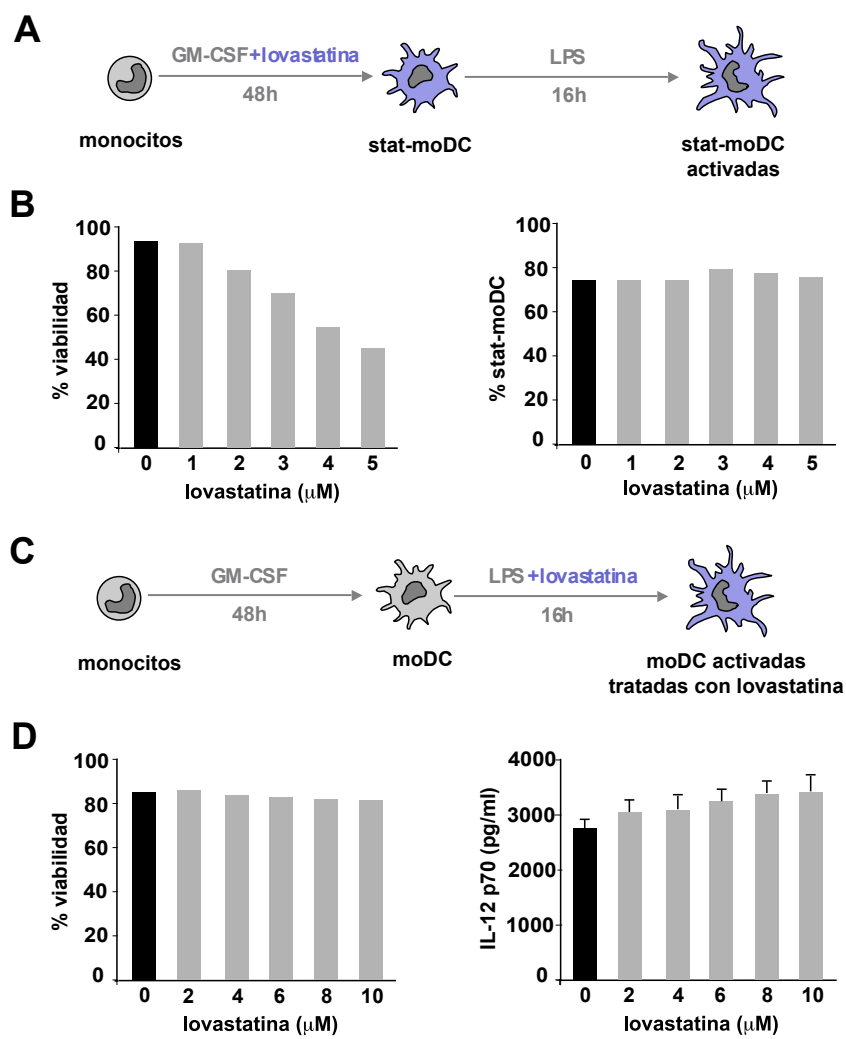


Figura R2. Diferenciación *in vitro* de moDC. **A.** Esquema de la diferenciación de monocitos a moDC en presencia de lovastatina y de la posterior activación de las stat-moDC. **B.** Viabilidad y porcentaje de stat-moDC en cultivos de monocitos durante 48 horas en presencia de 20 ng/ml GM-CSF y concentraciones crecientes de lovastatina. **C.** Esquema de la diferenciación de monocitos a moDC y de la posterior activación de las moDC en presencia de lovastatina. **D.** Viabilidad y producción de IL-12 p70 en moDC estimuladas durante 16 horas con LPS y concentraciones crecientes de lovastatina.

Respuesta a LPS de las stat-moDC

Caracterización fenotípica de las stat-moDC tras la activación con LPS

Las C-moDC obtenidas *in vitro* tras el cultivo durante 48 horas de monocitos con GM-CSF presentaban un fenotipo inmaduro, con niveles intermedios de moléculas de MHC-II y niveles bajos de moléculas de coestimulación y activación (CD86, CD40 y CD69). Tras la estimulación con 4 μ g de LPS durante 16 horas se generaban C-moDC con un fenotipo maduro, caracterizado por un incremento en la expresión de MHC-II y de las moléculas de coestimulación (Figura R3A-B). El tratamiento con 1 μ M lovastatina durante la diferenciación de los monocitos a moDC inducía un aumento en la expresión de MHC-II en las stat-moDC con respecto al nivel de las C-moDC, tanto en las stat-moDC sin estimular como tras la activación con LPS; por el contrario, las stat-moDC estimuladas con LPS expresaban niveles más bajos de CD86, CD40 y CD69 que las C-moDC (Figura R3A-B).

Figura R3

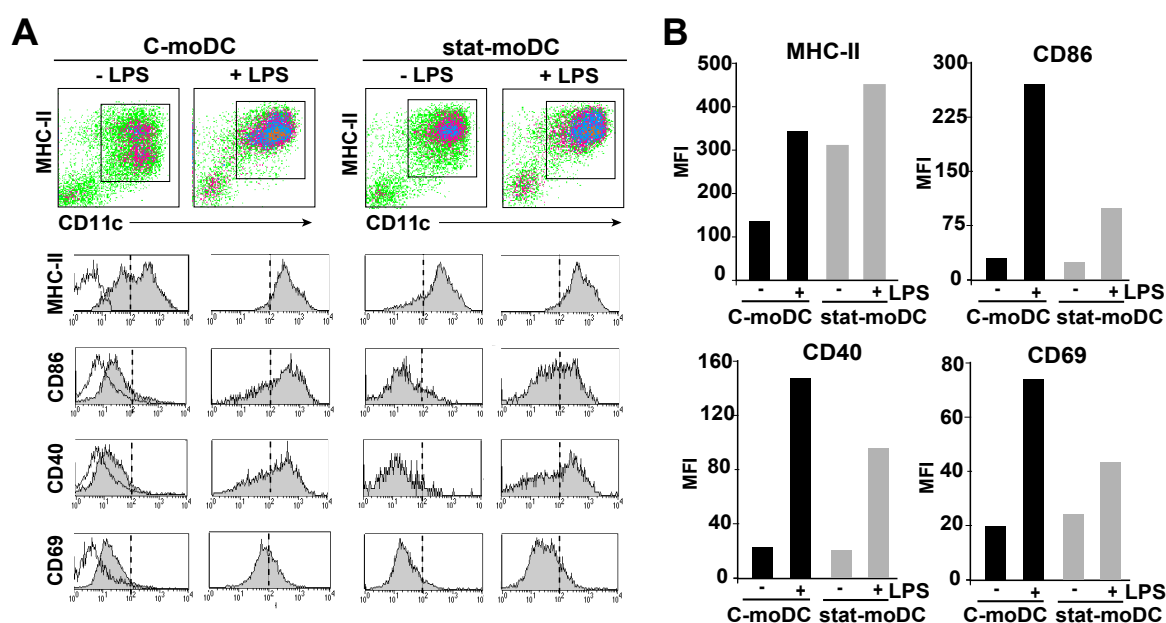


Figura R3. Efecto de la lovastatina en la activación de las moDC con LPS. A. Caracterización fenotípica de las moDC generadas en ausencia (C-moDC) o presencia de 1 μ M lovastatina (stat-moDC) en base a la expresión de MHC-II y CD11c, así como histogramas de la expresión de MHCII, moléculas de coestimulación como CD86 o CD40 y activación, CD69, en las C-moDC y stat-moDC sin estimular y en respuesta a LPS. El histograma blanco corresponde al marcaje de fondo. B. Cuantificación de la expresión de las moléculas de coestimulación del panel A en C-moDC y stat-moDC sin estimular y activadas con LPS, en base a la intensidad media de fluorescencia (MFI). Se muestra un experimento representativo.

Capacidad de las stat-moDC de estimulación *in vitro* de células T

Con el fin de determinar si esta reducción en las moléculas de coestimulación observada en las stat-moDC estaba correlacionada con una menor capacidad para estimular células T, realizamos un co-cultivo de moDC con células T CD4⁺ aisladas del bazo de ratones transgénicos OT-II, cuyo TCR reconoce de forma específica el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ presentado en contexto de MHC-II. Para ello, stat-moDC sin estimular y estimuladas con LPS fueron pulsadas durante 1 hora con el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ y, posteriormente, se cultivaron con células T OT-II en una relación célula T:DC de 10:1. La activación y proliferación de las células T OT-II se analizó a los 3 días (Figura R4A). Como se observa en la Figura R4B, las células T OT-II cultivadas con stat-moDC presentaban una menor activación que las estimuladas con C-moDC, con niveles inferiores de CD25 y una mayor expresión de CD62L; del mismo modo, la producción de IL-2 por células T OT-II estimuladas con stat-moDC era menor que en el caso de células T OT-II activadas con C-moDC (Figura R4B). Además analizamos la proliferación de dichas células T en base a la incorporación de timidina tritiada (³H-timidina), un precursor del DNA marcado con un isótopo radioactivo que se puede detectar al incorporarse a la síntesis de DNA. Observamos que el nivel de proliferación de las células T OT-II cultivadas con stat-moDC era inferior que en el caso del co-cultivo con C-moDC, y que esta menor proliferación de las células T OT-II estimuladas con stat-moDC estaba correlacionaba con una menor producción de IFN γ (Figura R4C). Este resultado indica que las moDC diferenciadas en presencia de lovastatina tienen una menor capacidad de estimulación de células T, lo que está de acuerdo con lo publicado anteriormente para BMDC de ratón (Sun and Fernandes, 2003); en dicho trabajo observaron que el tratamiento con lovastatina afectaba, de una forma dosis-dependiente, a la capacidad de las BMDC para estimular células T alogénicas en un ensayo de MLR (del inglés *mixed lymphocyte reaction*), en el cual se analizaba la proliferación de células T de bazo utilizando BMDC tratadas con lovastatina y mitomicina C como células estimuladoras.

Se ha descrito que la formación de la sinapsis inmunológica depende de la reorganización del citoesqueleto de actina tanto en las células T como en las DC (Dustin, 2006); además se ha establecido que las estatinas son capaces de interferir en la reorganización de la actina dentro de la célula mediante la inhibición de las enzimas Rho GTPasas (Koch et al., 1997). En base a estos antecedentes decidimos analizar si el tratamiento con lovastatina afectaba al citoesqueleto de actina de las moDC. Para ello, se analizó mediante microscopía confocal la cantidad y distribución de los filamentos de actina utilizando un anticuerpo que reconoce faloidina. La faloidina es una micotoxina producida por el hongo *Amanita phalloides* que tiene la capacidad de unir específicamente microfilamentos de actina y estabilizarlos, por lo que se puede utilizar para ensayos de microscopía empleando una variante marcada con un fluorocromo fluorescente, en este caso, Alexa-488. El análisis mediante microscopía confocal de los co-cultivos de moDC y células T OT-II, descritos en la Figura 4A, reveló que las stat-moDC presentaban una distribución alterada del citoesqueleto de actina, encontrándose la

faloidina formando un halo alrededor de la superficie de la célula; este fenómeno no ocurría en las C-moDC, en las que la faloidina estaba concentrada en la superficie celular (Figura R4D).

Por lo tanto, el defecto observado en las stat-moDC para estimular células T podría deberse a una activación anómala de dichas células dendríticas, que conduciría a un menor nivel de expresión de moléculas de coestimulación y a la alteración de la reorganización del citoesqueleto de actina.

Figura R4

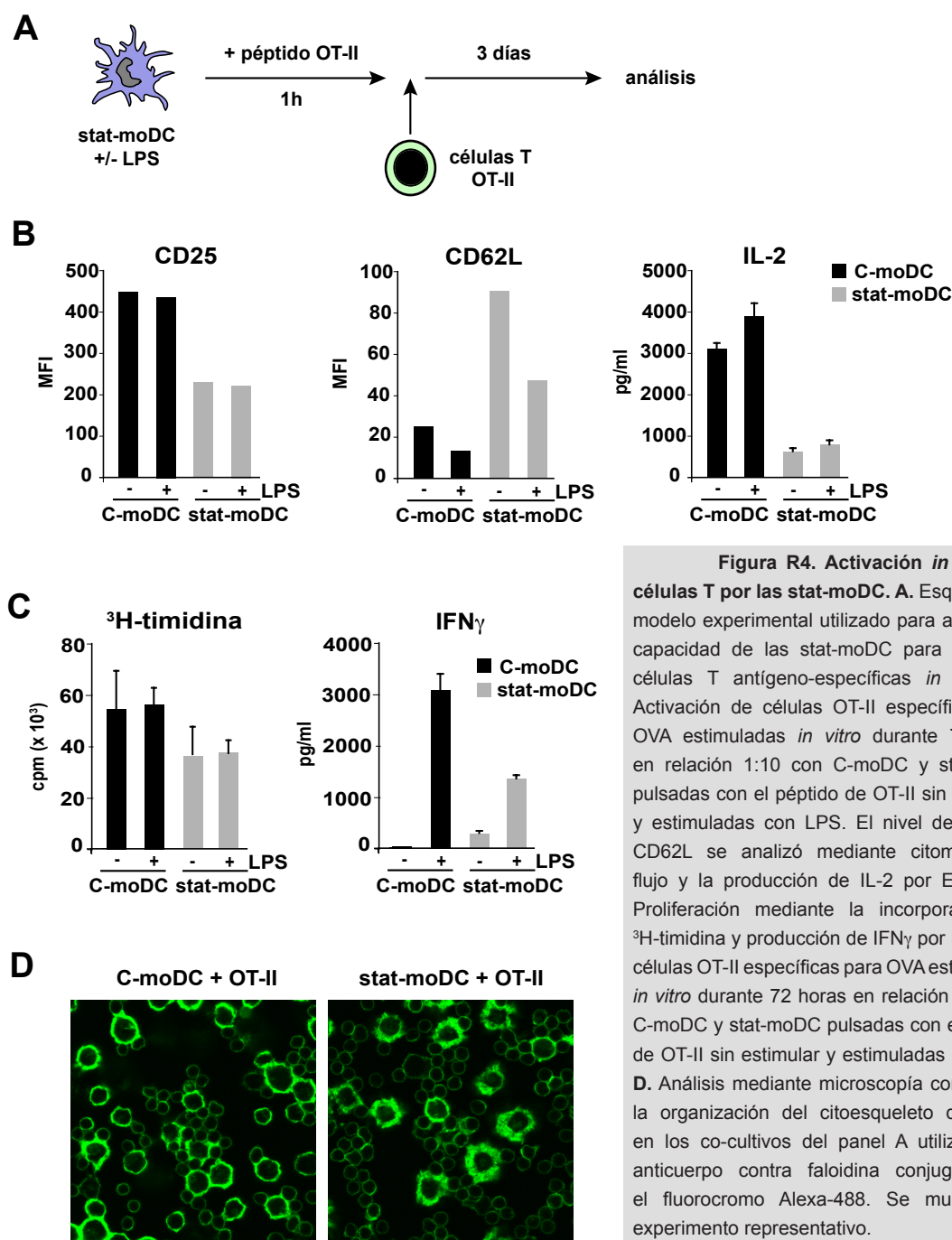
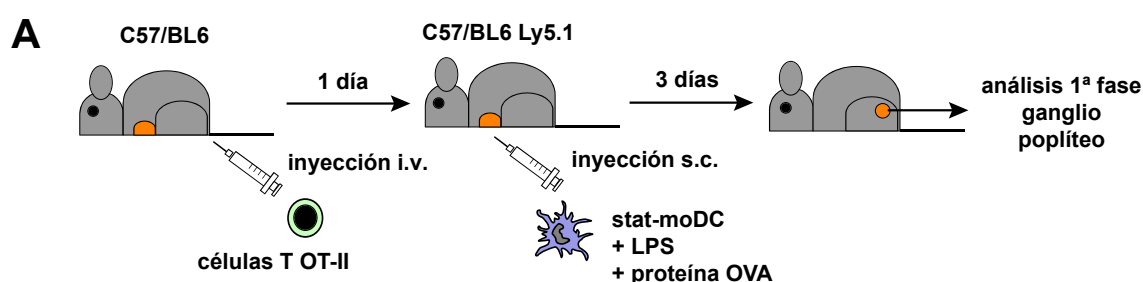


Figura R4. Activación *in vitro* de células T por las stat-moDC. **A.** Esquema del modelo experimental utilizado para analizar la capacidad de las stat-moDC para estimular células T antígeno-específicas *in vitro*. **B.** Activación de células OT-II específicas para OVA estimadas *in vitro* durante 72 horas en relación 1:10 con C-moDC y stat-moDC pulsadas con el péptido de OT-II sin estimular y estimuladas con LPS. El nivel de CD25 y CD62L se analizó mediante citometría de flujo y la producción de IL-2 por ELISA. **C.** Proliferación mediante la incorporación de ³H-timidina y producción de IFN γ por ELISA de células OT-II específicas para OVA estimadas *in vitro* durante 72 horas en relación 1:10 con C-moDC y stat-moDC pulsadas con el péptido de OT-II sin estimular y estimuladas con LPS. **D.** Análisis mediante microscopía confocal de la organización del citoesqueleto de actina en los co-cultivos del panel A utilizando un anticuerpo contra faloidina conjugado con el fluorocromo Alexa-488. Se muestra un experimento representativo.

Capacidad de las stat-moDC de estimulación *in vivo* de células T

Con el objetivo de determinar si la reducida capacidad de las stat-moDC para activar células T *in vitro* reflejaba un defecto en la estimulación de células T *in vivo*, se transfirieron por vía intravenosa en ratones C57BL/6 Ly5.1 células T aisladas de ratones OT-II y, al día siguiente, se inyectaron en la almohadilla plantar por vía subcutánea moDC diferenciadas en presencia o ausencia de lovastatina, pulsadas con la proteína OVA y estimuladas con LPS. A los tres días se analizó en el ganglio poplíteo drenante la activación y proliferación de las células T OT-II antígeno específicas transferidas (Figura R5A). En primer lugar, se identificaron las células OT-II utilizando un anticuerpo contra CD45.2, isoforma de la molécula CD45 expresada sólo por las células inyectadas, ya que los ratones Ly5.1 expresan la isoforma CD45.1. El porcentaje de células T OT-II presentes en el ganglio poplíteo tras su estimulación *in vivo* con stat-moDC pulsadas con OVA era similar al de células T OT-II activadas con C-moDC (Figura R5B, panel superior). Para comprobar que la activación de las células T OT-II era consecuencia de la presentación antígeno-específica por parte de las moDC se utilizaron C-moDC y stat-moDC sin pulsar, confirmando que en ausencia de antígeno las células T OT-II no se activaban correctamente (Figura R5B, panel inferior). Además se analizó la proliferación de dichas células T utilizando el trazador intracelular fluorescente CFSE, que permite determinar por citometría de flujo el porcentaje de células que han llevado a cabo un determinado número de divisiones; el CFSE es un colorante cuya fluorescencia se reparte equitativamente entre las células hijas en cada división que lleva a cabo la célula, permitiendo asignar cada pico de fluorescencia a una división. Como se muestra en la Figura R5C, no se observaban diferencias significativas en el número de divisiones celulares entre las células T OT-II estimuladas con stat-moDC y las estimuladas con C-moDC. Por último, se determinó el nivel de activación de las células OT-II mediante la expresión de CD25; observamos que las células T OT-II estimuladas con stat-moDC expresaban el mismo nivel de CD25 que las activadas con C-moDC (Figura R5D). Este resultado sugiere que el defecto observado en las stat-moDC para activar células T *in vitro* está contrarrestado *in vivo* por el entorno inflamatorio inducido en la zona de la inyección subcutánea, que promueve la correcta maduración de las stat-moDC y restaura su capacidad de estimulación de las células T.

Figura R5



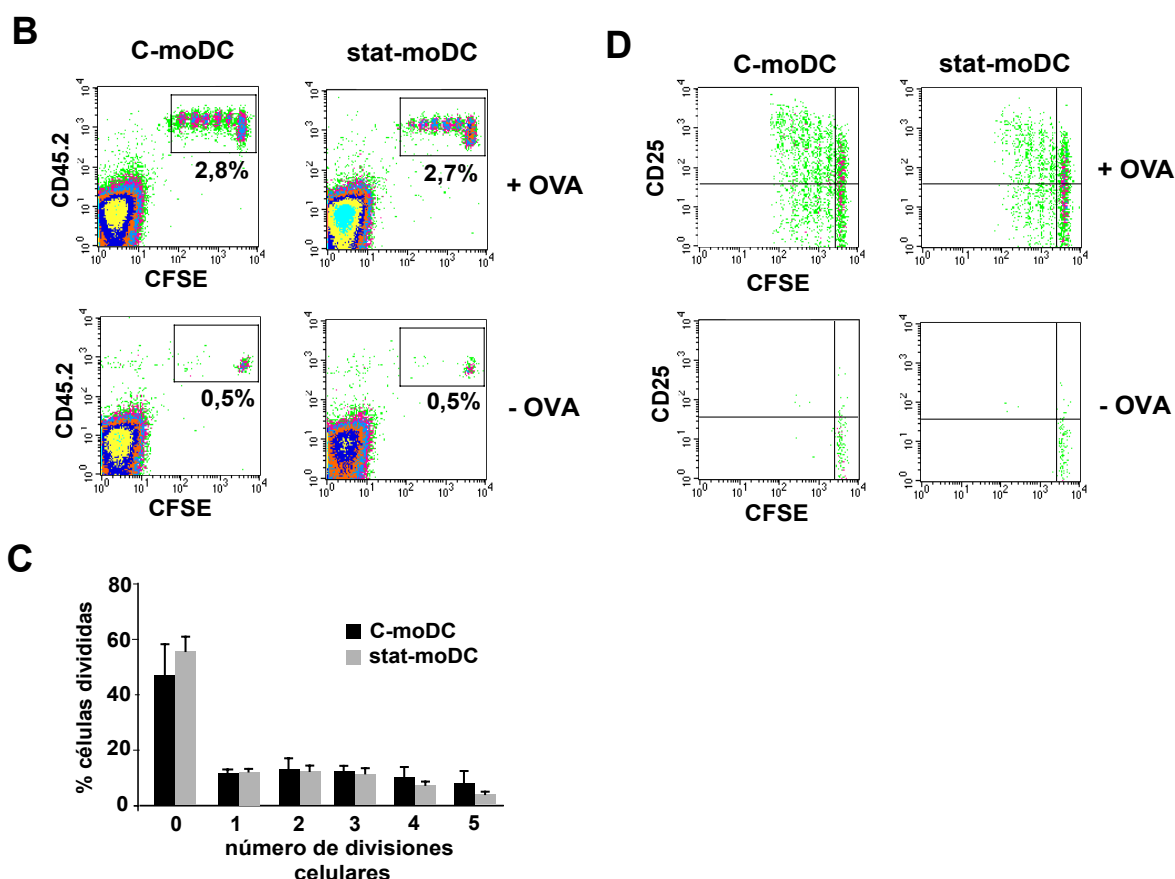


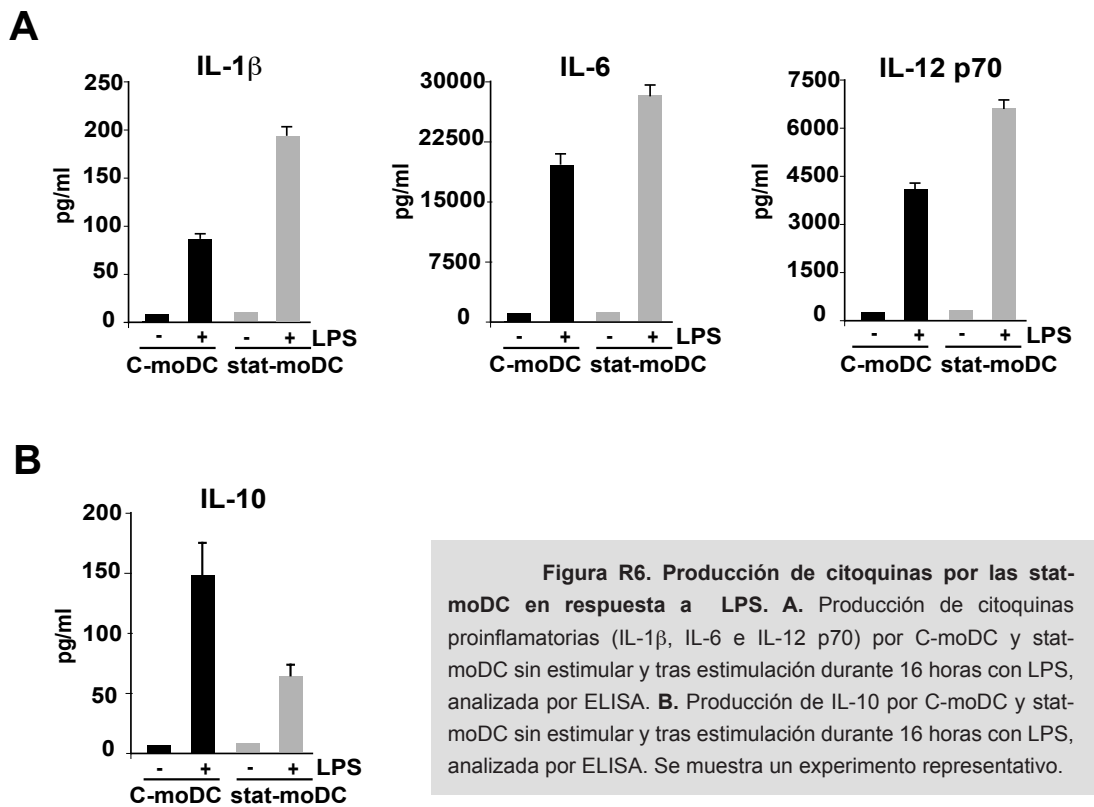
Figura R5. Activación *in vivo* de células T por las stat-moDC. **A.** Esquema del modelo experimental utilizado para analizar la capacidad de las stat-moDC para estimular células T antígeno-específicas *in vivo*. **B.** Porcentaje (células CD45.2⁺) y proliferación (dilución de CFSE) de células OT-II específicas para OVA estimuladas *in vivo* por C-moDC y stat-moDC pulsadas con la proteína OVA y sin pulsar. **C.** Porcentaje de células OT-II que han llevado a cabo un determinado número de divisiones (de 0 a 5) tras ser estimuladas *in vivo* por C-moDC y stat-moDC pulsadas con la proteína OVA. Se representa la media \pm SD de 3 ganglios poplíteos. **D.** Activación en base a la expresión de CD25 de células OT-II específicas para OVA estimuladas *in vivo* por C-moDC y stat-moDC pulsadas con la proteína OVA y sin pulsar.

Producción de citoquinas tras la activación de las stat-moDC con LPS

Las estatinas se consideran moléculas con efecto anti-inflamatorio (Dinarello, 2010), aunque en determinados tipos celulares pueden incrementar la producción de citoquinas proinflamatorias. Este efecto se ha descrito para BMDC y macrófagos peritoneales de ratón activados con LPS (Sun and Fernandes, 2003) (Matsumoto et al., 2004), y también para moDC y monocitos de sangre periférica activados con LPS en el sistema humano (Kiener et al., 2001), (Yilmaz et al., 2006). Por ese motivo, estudiamos en las moDC el efecto del tratamiento con lovastatina sobre la producción de citoquinas en respuesta a LPS. En primer lugar, analizamos la síntesis de citoquinas proinflamatorias y observamos que las stat-moDC producían una cantidad entre 1.5 y 2 veces superior de IL-1 β , IL-6 e IL-12 p70 que las C-moDC (Figura R6A), resultado que indica que la lovastatina modifica la respuesta a LPS de las moDC promoviendo un aumento en la síntesis de citoquinas proinflamatorias.

Asimismo determinamos la producción de IL-10 por las stat-moDC, citoquina que es considerada anti-inflamatoria. En este sentido, se ha descrito que la IL-10 disminuye la expresión de citoquinas Th1 como IFN γ (Fiorentino et al., 1989); además la síntesis de IL-10 regula la producción de IL-12, ya que es capaz de inhibir la expresión de la subunidad IL-12 p35 (Snijders et al., 1996). Analizamos la producción de IL-10 en respuesta a LPS y observamos que las stat-moDC producían menor cantidad de IL-10 que las C-moDC (Figura R6B), lo que podría explicar en parte el aumento en la síntesis de IL-12 observado durante la activación con LPS de las moDC diferenciadas en presencia de lovastatina.

Figura R6



Señalización mediada por TLR-4 en moDC activadas con LPS

Con el fin de explicar el incremento observado en la producción de citoquinas proinflamatorias en las stat-moDC, decidimos estudiar en detalle la respuesta inducida por el LPS. Como se ha descrito en la Figura 17, la señalización iniciada tras el reconocimiento de LPS por TLR-4 está compuesta de dos vías que dependen de las moléculas adaptadoras MyD88 y TRIF.

Señalización dependiente de MyD88 en las stat-moDC estimuladas con LPS

En primer lugar se analizó la vía dependiente de MyD88, que conduce a la activación de NF- κ B y AP-1, factores de transcripción que se translocan al núcleo para inducir la transcripción de citoquinas proinflamatorias. La formación del complejo AP-1 depende de la activación de las

MAPK p38, ERK y JNK , que a su vez está mediada por MyD88 (Akira et al., 2006).

Por este motivo, se analizó por Western Blot la fosforilación de p38 tras la estimulación con LPS en las moDC control y se comparó con las moDC diferenciadas en presencia de lovastatina. La cuantificación de la fosforilación de p38 reveló que en las stat-moDC la activación de esta MAPK a 1, 2 y 4 horas tras la estimulación con LPS era mayor que en las C-moDC (Figura R7A). Además se observó que en las stat-moDC la activación de p38 decaía con el tiempo desde 1 hora de estimulación con LPS hasta 4 horas; sin embargo, en las C-moDC la fosforilación de p38 analizada a los mismos tiempos de estimulación con LPS se mantenía a un nivel similar a lo largo del tiempo (Figura R7A).

Para determinar la activación de NF- κ B tras estimulación con LPS se analizó la translocación al núcleo de la subunidad p65 o RelA mediante microscopía confocal. Se eligió la subunidad p65 porque forma parte del heterodímero más abundante de la familia de factores de transcripción NF- κ B, que posee una función activadora de las células, el complejo p65/p50 (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). No se observaron diferencias en la expresión de p65 en el núcleo entre las stat-moDC y las C-moDC a ninguno de los tiempos de LPS analizados (Figura R7B), lo que sugiere que el tratamiento con lovastatina no afecta a la activación de NF- κ B inducida por LPS.

Figura R7

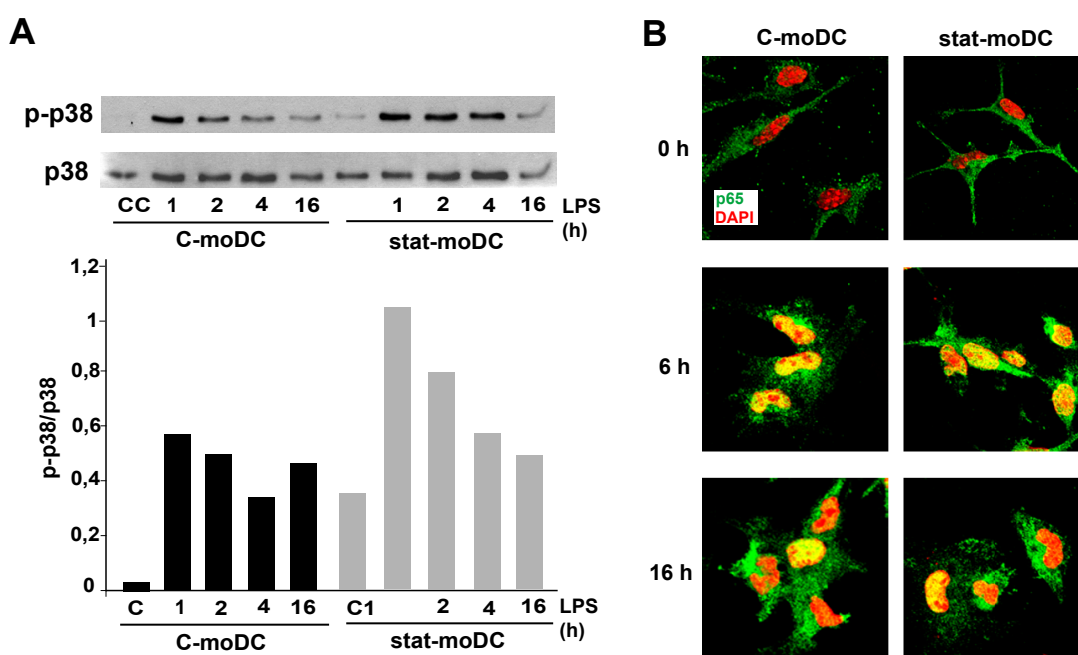


Figura R7. Efecto de la lovastatina sobre la activación de p38 MAPK y NF- κ B en las moDC en respuesta a LPS. **A.** Expresión por western-blot de p38 total y fosforilado en C-moDC y stat-moDC sin estimular y tras 1, 2, 4 y 16 horas de estimulación con LPS. La cuantificación de la fosforilación de p38 se llevó a cabo analizando la relación p-p38/p38 con el programa Adobe Photoshop. **B.** Translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B en las C-moDC y stat-moDC estimuladas durante 6 y 16 horas con LPS. Mediante microscopía confocal se analizó la expresión de p65 (verde), utilizando para el marcaje de los núcleos (rojo) el colorante fluorescente DAPI, que se une al DNA.

Señalización dependiente de TRIF en las stat-moDC estimuladas con LPS

A continuación analizamos la vía de TLR-4 dependiente de la molécula adaptadora TRIF, que induce la producción de IFN β ; TRIF activa el factor de transcripción IRF3, el cual junto con NF- κ B y AP-1 inicia la transcripción de IFN β (Kawai and Akira, 2007). Se analizó la producción de IFN β tras la estimulación con LPS y se observó que las stat-moDC producían aproximadamente dos veces más IFN β que las C-moDC (Figura R8A). Con el objetivo de determinar si este incremento en la producción de IFN β tenía lugar a nivel transcripcional, se analizó por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) la expresión de mRNA específico para IFN β a diferentes tiempos tras estimulación con LPS. Como se observa en la Figura R8B, el nivel de mRNA para IFN β era muy superior en las stat-moDC a partir de los 60 minutos de estimulación con LPS, comparado con la inducción en las C-moDC. Estos datos apoyan que la elevada producción de IFN β detectada en el sobrenadante de los cultivos de las stat-moDC activadas con LPS se debe a una mayor transcripción de esta citoquina en presencia de lovastatina.

En resumen, el tratamiento con lovastatina durante la diferenciación de los monocitos afecta a la respuesta a LPS de las moDC, conduciendo a un aumento en la producción de las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 e IL-12 p70) e IFN β , fenómeno que está correlacionado con una mayor activación de p38 MAPK.

Figura R8

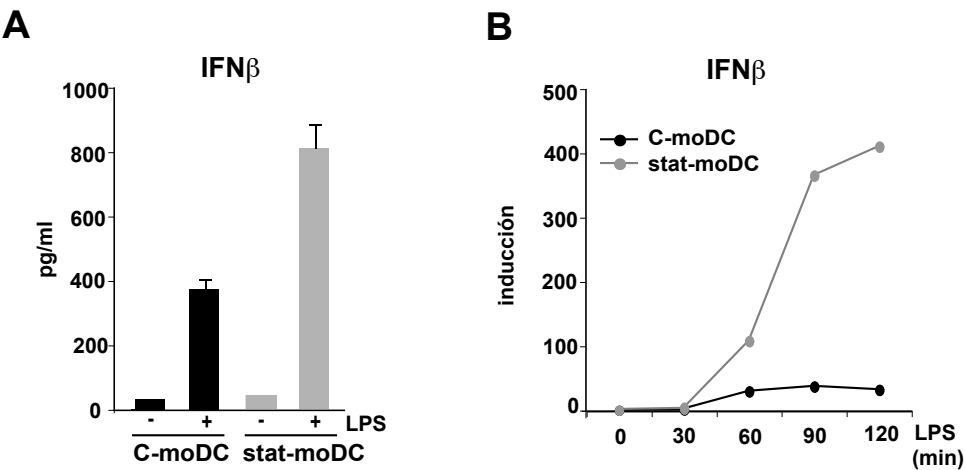


Figura R8. Producción de IFN β por las stat-moDC en respuesta a LPS. **A.** Producción por ELISA de IFN β en C-moDC y stat-moDC estimuladas durante 16 horas con LPS. **B.** mRNA específico para IFN β en C-moDC y stat-moDC estimuladas con LPS a distintos tiempos, analizada por qPCR. Se representa la inducción de IFN β a cada tiempo de LPS, normalizada a β -actina, en relación a la expresión a tiempo cero. Se muestra un experimento representativo.

Señalización dependiente de IFNAR tras la estimulación de las moDC con LPS

Producción autocrina de IFN de tipo I en las moDC estimuladas con LPS

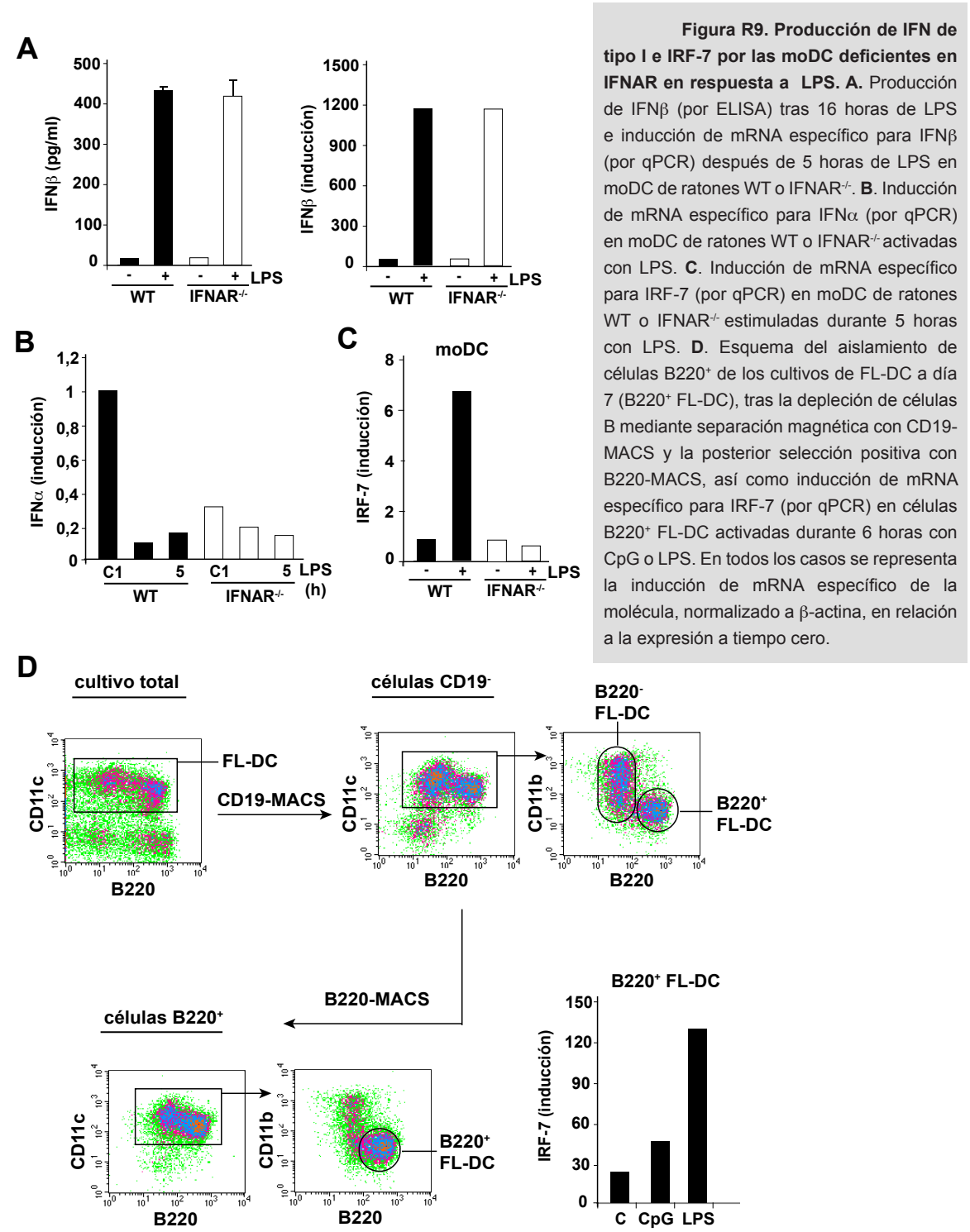
Se ha descrito que en BMDC de ratón diferenciadas en presencia de GM-CSF y $\text{TNF}\alpha$ y estimuladas con LPS, se amplifica la producción de $\text{IFN}\beta$ mediante un mecanismo de estimulación autocrina a través del receptor de IFN de tipo I (IFNAR), que se activa tras una primera fase de producción de $\text{IFN}\beta$ inducida por LPS y mediada por TRIF (Gautier et al., 2005).

Para determinar si esta señalización autocrina ocurría también en las moDC, se analizó la producción de $\text{IFN}\beta$ en moDC de ratones deficientes para IFNAR (IFNAR KO). Después de ser estimuladas durante 16 horas con LPS, las moDC de los ratones IFNAR KO producían una cantidad similar de $\text{IFN}\beta$ que las moDC de ratones WT ([Figura R9A, izquierda](#)). Además determinamos por qRT-PCR la expresión de $\text{IFN}\beta$ a nivel de mRNA en moDC de ratones WT y KO estimuladas 5 horas con LPS y observamos que la síntesis de $\text{IFN}\beta$ en moDC KO era equivalente a la de moDC WT ([Figura R9A, derecha](#)), resultado que apoyaba la similar producción de $\text{IFN}\beta$ observada en moDC de ratones WT e IFNAR KO. Estos datos sugieren que la señalización inducida por $\text{IFN}\beta$ de forma autocrina sobre el receptor IFNAR no se traduce en una segunda oleada de producción de $\text{IFN}\beta$ en las moDC. Analizamos también la síntesis de $\text{IFN}\alpha$, el otro componente de la familia de IFN de tipo I; el análisis mediante qRT-PCR del mRNA específico para $\text{IFN}\alpha$ reveló que las moDC no eran capaces de inducir $\text{IFN}\alpha$ en respuesta a LPS, a ninguno de los tiempos analizados ([Figura R9B](#)), resultado que está de acuerdo con lo que se ha propuesto para BMDC de ratón estimuladas con LPS (Gautier et al., 2005).

Nos planteamos que la ausencia en las moDC de una segunda fase de producción de $\text{IFN}\beta$ inducida por la señalización autocrina a través de IFNAR podía deberse a un defecto en la síntesis del factor de transcripción IRF-7, ya que se ha descrito que es necesario para la producción autocrina de IFN de tipo I inducida por IFNAR en DC plasmacitoides (pDC) estimuladas con CpG (Honda et al., 2005), así como en BMDC y DC convencionales (cDC) estimuladas secuencialmente con $\text{IFN}\beta$ y LPS (Sakaguchi et al., 2003) (Richez et al., 2009). Por lo tanto, decidimos analizar la síntesis de IRF-7 en moDC de ratones WT e IFNAR KO tras la activación con LPS; el resultado fue que las moDC eran capaces de inducir la expresión de IRF-7, y que esa síntesis estaba mediada por la señalización a través de IFNAR, ya en las moDC de ratones deficientes para IFNAR no se observaba inducción de IRF-7 ([Figura R9C](#)). Sin embargo, la síntesis de IRF-7 inducida por IFNAR no se traducía en un incremento en la producción de $\text{IFN}\beta$, como se ha demostrado en la [Figura R9A](#). Una explicación para este fenómeno podría ser el bajo nivel de inducción de IRF-7 en las moDC comparado con las pDC, que están especializadas en la producción de IFN de tipo I debido a su capacidad para sintetizar rápida y eficientemente IRF-7 en respuesta a distintos ligandos de TLR (Honda et al., 2005). Utilizamos pDC diferenciadas a partir de médula ósea total en presencia del ligando de Flt3

(FL-DC); a día 7 de cultivo se aislaron las pDC por selección magnética, deplecionando primero las células B con un anticuerpo anti-CD19 y, posteriormente, seleccionando positivamente las pDC con un anticuerpo anti-B220 (Figura R9D). Cuando comparamos la inducción de IRF-7 en moDC en respuesta a LPS (Figura R9C) con la de pDC de los cultivos de FL-DC (B220⁺ FL-DC) en respuesta a LPS o CpG (Figura R9D), observamos que la expresión de IRF-7 en las moDC era muy inferior a la de las pDC.

Figura R9



Regulación del metabolismo del óxido nítrico en las stat-moDC estimuladas con LPS

Las DC son células especializadas en la presentación de antígenos a células T, pero también participan en la respuesta inmunológica frente a patógenos mediante la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF α . Asimismo son capaces de sintetizar óxido nítrico (NO), que posee una función bactericida ayudando a la eliminación del patógeno, y que además tiene un papel protector de la célula frente al estrés oxidativo (Bogdan, 2001). En relación con el papel microbicida del NO, se ha demostrado que su reacción con el anión superóxido (O₂⁻) genera peroxinitrito (ONOO⁻), una potente molécula oxidante y citotóxica capaz de eliminar al patógeno (MacMicking et al., 1997). En cuanto a la importancia del NO en la función de las DC, se ha descrito recientemente que existe una subpoblación de DC caracterizada por la producción de NO y TNF α (denominada TipDC). Las TipDC se caracterizaron por primera vez en un modelo de infección con *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003) y desempeñan un papel fundamental en la respuesta temprana frente a bacterias o parásitos, participando en la eliminación del patógeno durante las primeras horas de la infección. Además se ha propuesto que las TipDC son moDC que derivan de monocitos Ly-6C^{high} reclutados desde la sangre por un mecanismo dependiente de CCR2, el cual regula la salida de los monocitos de la médula ósea durante la infección (Serbina and Pamer, 2006).

En base a estos antecedentes analizamos la producción de NO por las stat-moDC en respuesta a LPS con el fin de determinar si estaba afectada, al igual que la síntesis de citoquinas proinflamatorias, por el tratamiento con lovastatina. Como se observa en la [Figura R10A](#), las stat-moDC producían aproximadamente la mitad de NO que las C-moDC. Puesto que la enzima iNOS cataliza la síntesis de NO dentro de la célula a partir del aminoácido L-arginina y oxígeno molecular (MacMicking et al., 1997), se analizó la expresión de iNOS tras estimulación con LPS y se observó que la disminución de NO en las stat-moDC estaba correlacionada con una menor inducción de iNOS ([Figura R10B](#)).

Contribución de la vía de IFNAR al metabolismo del NO en las moDC estimuladas con LPS

Es necesario aclarar que a partir de este momento, y por motivos de simplificación en la redacción, nos referiremos a la señalización iniciada directamente por el LPS como la vía dependiente de TLR-4, denominando vía dependiente de IFNAR a la inducida por el IFN β , aunque como se ha comentado anteriormente la síntesis del IFN β depende de la señalización mediada por TLR-4 y, por lo tanto, es también inducida por el LPS.

En macrófagos de ratón se ha descrito que la expresión de iNOS en respuesta a LPS está controlada por la vía de STAT-1/IRF-1 (Kamijo et al., 1994) y requiere la activación del factor de transcripción NF- κ B (Xie et al., 1994). Para determinar la contribución de la

señalización inducida por IFNAR a la síntesis de NO en las moDC, se analizó la producción de NO y la síntesis de iNOS en moDC de ratones IFNAR KO. En ausencia del receptor para IFN de tipo I, las moDC activadas con LPS apenas producían NO (Figura R10A); además la inducción de iNOS tras la estimulación con LPS era significativamente menor en las moDC de ratones deficientes para IFNAR (Figura R10B). Este resultado indica que la inducción de ambas moléculas depende mayoritariamente de la señalización iniciada por IFNAR. Sin embargo, el IFN de tipo I no es suficiente para iniciar la síntesis de iNOS, ya que la estimulación de las moDC sólo con IFN β , en ausencia del ligando de TLR, no inducía la producción de NO (Figura R10C). Por lo tanto, la vía dependiente de TLR-4 es imprescindible para la síntesis de iNOS, como ocurre en macrófagos de ratón estimulados con LPS, en los cuales se ha demostrado que la activación del promotor de iNOS depende de la unión de NF- κ B, que es activado por TLR4 (Xie et al., 1994).

Figura R10

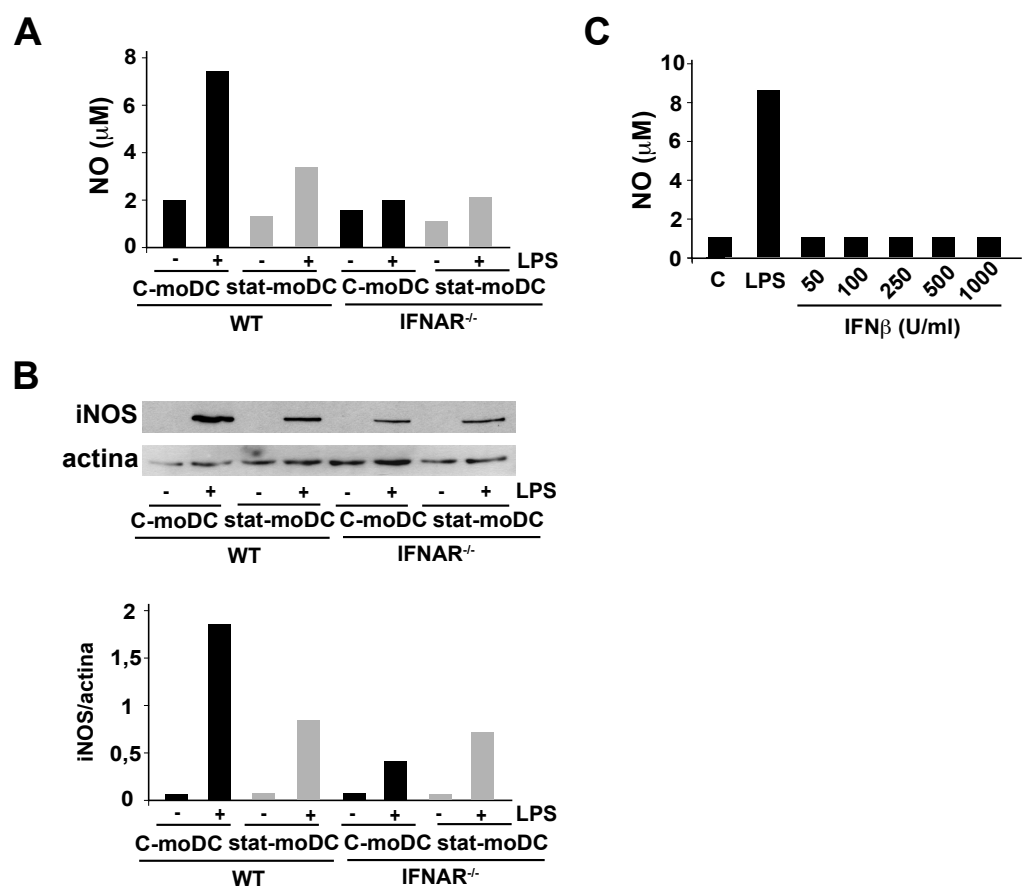


Figura R10. Metabolismo del óxido nítrico en las moDC en respuesta a LPS. **A.** Producción de NO, utilizando una variante del reactivo de Griess que detecta la concentración de nitritos, por C-moDC y stat-moDC de ratones WT e IFNAR^{-/-} estimuladas durante 16 horas con LPS. **B.** Expresión de iNOS por western blot en C-moDC y stat-moDC de ratones WT e IFNAR^{-/-} estimuladas durante 16 horas con LPS. La cuantificación de la síntesis de iNOS se llevó a cabo analizando la relación iNOS/actina con el programa Adobe Photoshop. **C.** Producción de NO por C-moDC estimuladas con LPS y 50, 100, 250, 500 y 1000 U/ml de IFN β durante 16 horas.

Finalmente, al analizar el metabolismo del NO en ratones deficientes para IFNAR no observamos una reducción en las stat-moDC comparado con las C-moDC en la producción de NO tras la estimulación con LPS (Figura R10A). Tampoco existía una disminución en la síntesis de iNOS entre las stat-moDC y C-moDC de ratones IFNAR KO (Figura R10B), lo que sugería que la lovastatina afectaba principalmente a la vía dependiente de IFNAR, inhibiendo tanto la síntesis de iNOS como la producción de NO. Para confirmar esta hipótesis se analizó la expresión tras activación con LPS del factor de transcripción IRF-1, un miembro de la familia de los IRF (del inglés *IFN regulatory factor*), cuya inducción en macrófagos está mediada por IFN y que se une al promotor de iNOS iniciando su síntesis (Kamijo et al., 1994). El análisis de la inducción de IRF-1 mediada por LPS en las stat-moDC reveló que la expresión de IRF-1 era muy inferior a la observada en las C-moDC a los distintos tiempos analizados (Figura R11A). Se ha demostrado que la estimulación de IFNAR por el IFN de tipo I conduce a la formación de dos complejos activadores de la transcripción: el factor activado por IFN α (AAF), que es un homodímero de STAT1 (del inglés *signal transducer and activator of transcription 1*) y el factor 3 del gen estimulado por IFN (ISGF3), que está formado por STAT1, STAT2 e IRF-9 (Taniguchi and Takaoka, 2002). El complejo AAF es el responsable de inducir la transcripción de IRF-1 y, por este motivo, se determinó el nivel de activación de STAT-1, para comprobar si la reducción de IRF-1 observada en las stat-moDC era una consecuencia de una menor activación de STAT-1. Como se muestra en la Figura R11B, la fosforilación de STAT-1 en las stat-moDC estimuladas con LPS era menor que en las C-moDC, resultado que apoyaba la existencia de un efecto inhibitorio de la lovastatina sobre la vía iniciada por IFNAR.

Figura R11

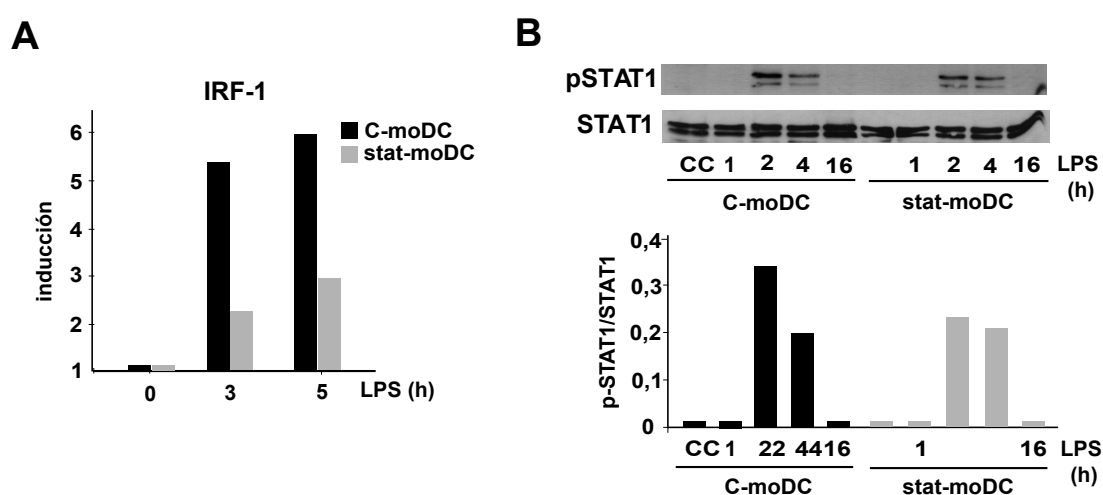


Figura R11. Efecto de la lovastatina sobre la señalización inducida por IFNAR en las moDC activadas con LPS. A. Inducción de mRNA específico para IRF-1 en C-moDC y stat-moDC a distintos tiempos de estimulación con LPS, analizada por qPCR. **B.** Expresión por western blot de STAT-1 total y fosforilado en C-moDC y stat-moDC activadas con LPS a varios tiempos. La cuantificación de la fosforilación de STAT-1 se llevó a cabo analizando la relación p-STAT-1/STAT-1 con el programa Adobe Photoshop.

Regulación de la producción de citoquinas por TLR-4 e IFNAR en las moDC activadas con LPS

Los resultados anteriores demuestran que el tratamiento con lovastatina durante la diferenciación de las células dendríticas derivadas de monocitos modifica de forma diferente la vía dependiente de TLR-4, iniciada por el LPS, y la vía dependiente de IFNAR, que se inicia cuando el IFN β inducido por el LPS señala de forma autocrina. La lovastatina regula positivamente la señalización por TLR-4, lo que se traduce en un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias e IFN β por las stat-moDC en respuesta a LPS. Por el contrario, en presencia de lovastatina la vía dependiente de IFNAR está parcialmente inhibida y, como consecuencia, la producción de NO en respuesta a LPS es menor.

Respecto al incremento en la producción de IL-12 en las stat-moDC, hay que tener en cuenta que la forma activa de esta citoquina es un heterodímero (IL-12 p70) formado por las subunidades IL12-p40 e IL-12 p35, cuya síntesis se ha propuesto que está controlada por TLR-4 e IFNAR, respectivamente (Honda et al., 2006). Por lo tanto, de acuerdo con lo establecido anteriormente, la inhibición parcial de la vía de IFNAR por el tratamiento con lovastatina debería traducirse en una reducción en la síntesis de IL-12 p35, que conllevaría una disminución en la producción de IL-12 p70, ya que se ha sugerido que p35 es la subunidad limitante para la producción de IL-12 (Snijders et al., 1996). Sin embargo, nuestros resultados indican que las stat-moDC producen cantidades mayores de IL-12 que las C-moDC en respuesta a LPS ([Figura R6A](#)).

Con el fin de explicar este fenómeno, decidimos analizar la contribución relativa de TLR-4 e IFNAR a la producción de IL-12 en las moDC activadas con LPS utilizando los ratones deficientes para el receptor de IFN de tipo I. Como se observa en la [Figura R12A](#), las moDC de ratones IFNAR KO producían aproximadamente la mitad de IL-12 p70 que las moDC de ratones WT tras estimulación con LPS. Además se determinó por qRT-PCR la expresión de las subunidades IL12 p40 e IL12 p35 a nivel de mRNA. En respuesta a LPS la subunidad p35 se inducía a un nivel menor en las moDC de ratones IFNAR KO que en moDC de ratones WT; por el contrario, la inducción de la subunidad p40 en moDC de ratones deficientes para IFNAR apenas estaba afectada comparada con la observada en moDC de ratones WT ([Figura R12B](#)). Por lo tanto, según este resultado, en moDC la síntesis de IL-12 p40 depende mayoritariamente de TLR-4 mientras que la inducción de IL-12 p35 depende tanto de TLR-4 como de IFNAR, a diferencia de lo que se ha propuesto para BMDC de ratón estimuladas con LPS, en las que se ha descrito que la expresión de p35 depende esencialmente de la vía iniciada por IFNAR (Gautier et al., 2005). Esta discrepancia sugiere que la regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias puede variar entre diferentes subpoblaciones de células dendríticas. Además estos datos permiten explicar el aumento en la producción de IL-12 p70 observado en las moDC diferenciadas en presencia de lovastatina; este incremento sería el resultado del

aumento en p40 y p35 debido a la regulación positiva de la lovastatina sobre la vía de TLR-4, que contrarrestaría la disminución en p35 debida a la inhibición parcial de la vía de IFNAR.

Se analizó también la contribución de la señalización iniciada por IFNAR a la producción de otras citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β e IL-6. El análisis por qRT-PCR de la expresión de estas citoquinas a nivel de mRNA en moDC de ratones deficientes para el receptor de IFN de tipo I reveló que la inducción tanto de IL-1 β como de IL-6 en las moDC de ratones IFNAR KO activadas con LPS era similar a la de moDC de ratones WT (Figura R12C). Estos datos sugieren que, en respuesta a LPS, la síntesis de IL-1 β e IL-6 en las moDC depende casi exclusivamente de la vía de TLR-4.

Figura R12

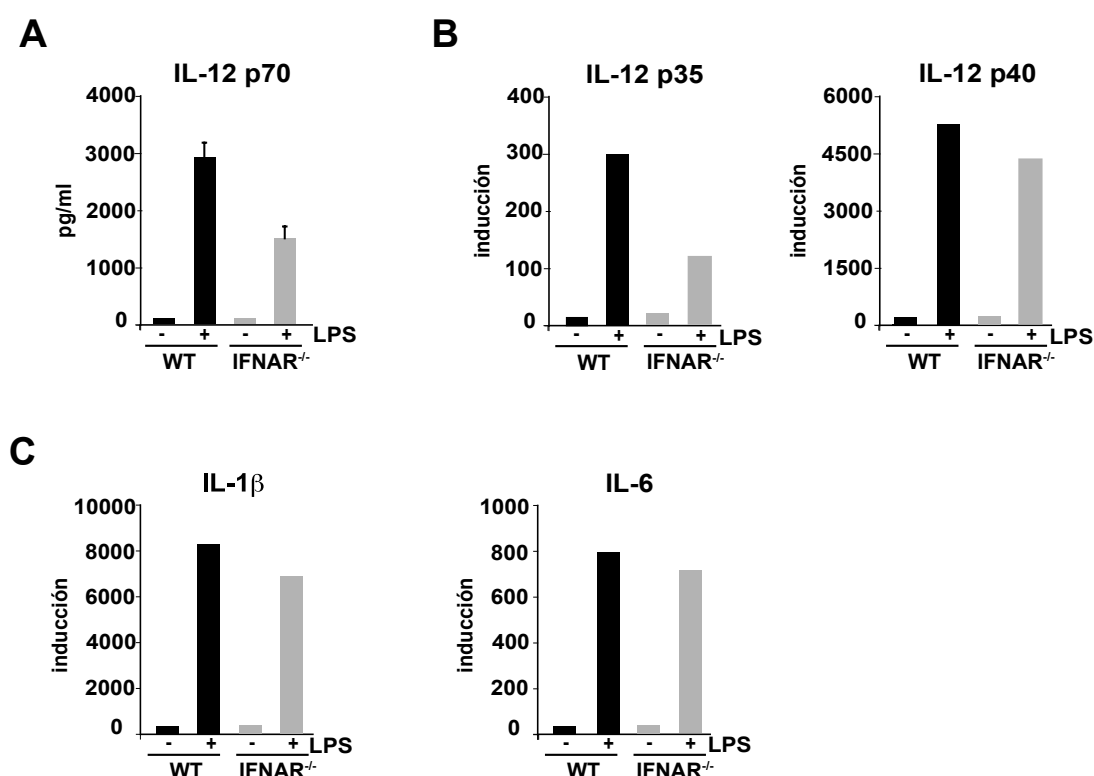


Figura R12. Producción de citoquinas proinflamatorias por las moDC deficientes en IFNAR en respuesta a LPS. **A.** Producción de IL-12 p70 por moDC de ratones WT e IFNAR^{-/-} estimuladas durante 16 horas con LPS, analizada por ELISA. **B.** Inducción de mRNA específico para IL-12 p35 y p40 en moDC de ratones WT e IFNAR^{-/-} tras 5 horas de estimulación con LPS, analizada por qPCR. **C.** Inducción de mRNA específicos para IL-1 β e IL-6 por moDC de ratones WT e IFNAR^{-/-} estimuladas durante 5 horas con LPS, analizada por qPCR. Se muestra un experimento representativo.

Regulación de la expresión de moléculas de coestimulación por TLR-4 e IFNAR en las moDC activadas con LPS

Se ha descrito que las BMDC de ratones deficientes para IFNAR presentan un defecto en la expresión de moléculas de coestimulación en respuesta a LPS, en base a la menor inducción de CD40 en las DC de ratones IFNAR KO respecto a las DC de ratones WT (Honda et al., 2003).

Determinamos en las moDC la contribución de la vía de IFNAR a la expresión de moléculas de coestimulación tras la activación con LPS, con el objetivo de comprobar si la ausencia de la señalización inducida por el IFN de tipo I tenía el mismo efecto que en las BMDC o, si por el contrario, había diferencias entre ambos tipos de DC, como se ha demostrado anteriormente para la producción de IFN β (Figura R9A) o la subunidad IL-12 p35 (Figura R12B). Observamos que las moDC de ratones IFNAR KO estimuladas con LPS expresaban niveles inferiores de MHC-II, CD86 y CD69 que las moDC de ratones WT (Figura R13), lo que confirmaba que en ausencia de IFNAR las moDC no regulaban correctamente las moléculas de coestimulación y activación en respuesta a LPS. Sin embargo, sí eran capaces de expresar parcialmente dichas moléculas, lo que parece indicar que la maduración a nivel fenotípico inducida por el LPS en las moDC depende tanto de la vía de TLR-4 como de IFNAR.

Figura R13

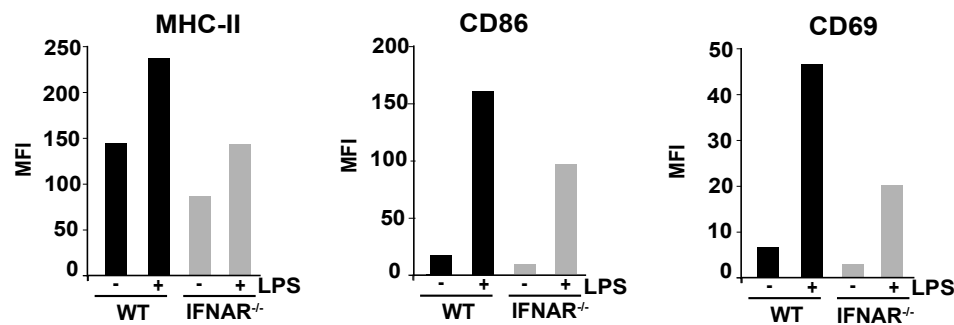


Figura R13. Activación de las moDC deficientes en IFNAR en respuesta a LPS. Expresión de MHC-II, CD86 y CD69 en moDC de ratones WT e IFNAR^{-/-} sin estimular y activadas durante 16 horas con LPS, analizada por citometría de flujo en base a la intensidad media de fluorescencia (MFI). Se muestra un experimento representativo.

Reversión de los efectos de la lovastatina sobre la respuesta a LPS de las moDC por la adición de mevalonato

Como se ha comentado en la Introducción, las estatinas son inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-(HMG)-coenzima A reductasa, que cataliza la conversión del hidroximetilglutaril (HMG) a mevalonato, una de las primeras etapas de la síntesis del colesterol. El resultado de esta inhibición es la reducción en los niveles de colesterol dentro de la célula, así como de otros metabolitos intermedios como el farnesil-pirofosfato y el geranilgeranil-pirofosfato. Estos isoprenoides regulan mediante la prenilación a nivel post-traducciona la función de numerosas proteínas que actúan como interruptores moleculares, incluyendo las proteínas GTPasas pequeñas (RAS, RAC y RHO) y proteínas de la familia Rab de proteínas G relacionadas con Ras. Estas proteínas regulan una gran variedad de funciones biológicas

debido a su capacidad para iniciar y finalizar multitud de procesos biológicos. La familia Ras regula la expresión génica, la familia Rho está implicada en la reorganización del citoesqueleto y en la expresión génica y la familia Rab regula el tráfico vesicular (Takai et al., 2001). Se ha demostrado que la incorporación de un grupo prenil lipofílico permite a estas proteínas el anclaje a las membranas celulares, y que este paso en muchas ocasiones es imprescindible para que puedan llevar a cabo sus funciones dentro del sistema inmune, que incluyen la captura de antígeno, procesamiento y presentación por parte de las células presentadoras, la activación, proliferación y función de los linfocitos, así como la migración de los linfocitos y neutrófilos (Greenwood et al., 2006). Además de promover la interacción con la membrana, la prenilación parece que tiene un importante papel en las uniones proteína-proteína (Zhang and Casey, 1996). Por lo tanto, debido a su efecto sobre la síntesis de los isoprenoides necesarios para la prenilación de las proteínas, las estatinas son capaces de afectar de forma indirecta la función de muchas proteínas de señalización celular.

Para determinar si los cambios observados en la respuesta a LPS de las stat-moDC son debidos al efecto inhibitorio de la lovastatina sobre la síntesis del colesterol, se diferenciaron monocitos en presencia de lovastatina y mevalonato y se analizó la respuesta a LPS de las moDC generadas. Tanto el aumento en la producción de IL-12 p70 como la disminución en la síntesis de NO observados en presencia de lovastatina se revertían cuando se añadía mevalonato al cultivo (Figura R14A-B). Este resultado confirma que la regulación de la lovastatina sobre la señalización inducida por LPS en las moDC es una consecuencia de la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa, es decir, del bloqueo de la ruta de síntesis del colesterol, y no se debe a la acción directa de la lovastatina sobre la vía de TLR-4 o IFNAR.

Figura R14

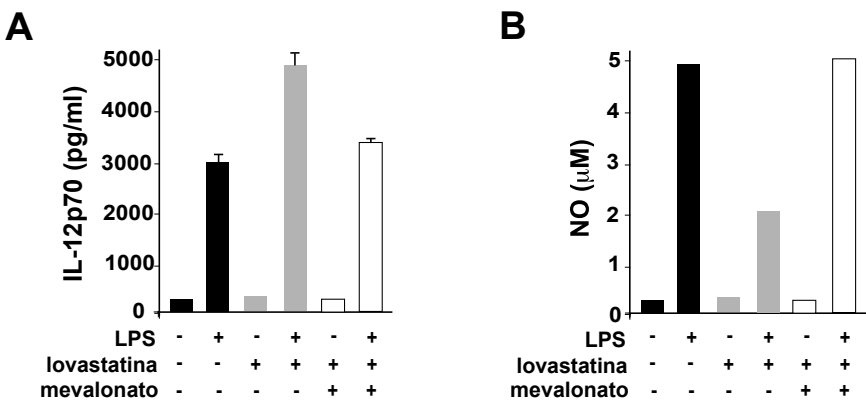


Figura R14. Reversión de los efectos de la lovastatina sobre las moDC activadas con LPS por la adición de mevalonato. **A.** Producción de IL-12 p70 por moDC control (negro), moDC diferenciadas en presencia de 1 μM lovastatina (gris) y moDC diferenciadas en presencia de 1 μM lovastatina y 150 μM mevalonato (blanco), sin estimular y tras estimulación durante 16 horas con LPS, analizada por ELISA. **B.** Producción de NO, utilizando una variante del reactivo de Griess que detecta la concentración de nitritos, por moDC control (negro), moDC diferenciadas en presencia de lovastatina (gris) y moDC diferenciadas en presencia de lovastatina y mevalonato (blanco), sin estimular y tras estimulación durante 16 horas con LPS. Se muestra un experimento representativo.

Potencial de citoprotección de las stat-moDC estimuladas con LPS

Además de su función microbicida frente a patógenos, el NO tiene un papel citoprotector, ya que es capaz de inducir la expresión de moléculas que ayudan a proteger a la célula frente al estrés oxidativo (Bogdan, 2001). Una de las principales moléculas citoprotectoras es la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), que tiene características anti-inflamatorias, anti-apoptóticas y anti-proliferativas. La HO-1 es la única enzima que poseen la células para metabolizar el grupo hemo, degradándolo a monóxido de carbono en forma gaseosa (CO), biliverdina y hierro libre (Fe^{2+}), productos que son responsables de los efectos protectores de la HO-1 (Otterbein et al., 2003). Por un lado, se ha demostrado que el CO tiene propiedades anti-inflamatorias en monocitos y macrófagos (Otterbein et al., 2000). Por otro lado, la biliverdina es convertida a bilirrubina por la acción de la biliverdina reductasa, siendo ambas moléculas potentes anti-oxidantes (Baranano et al., 2002). Por último, el hierro libre (Fe^{2+}) induce la expresión de ferritina, una proteína multimérica quelante del hierro, que limita la generación de radicales libres (Balla et al., 1992).

Analizamos la inducción de HO-1 en las stat-moDC estimuladas con LPS para determinar si la inhibición observada en la expresión de iNOS y en la producción de NO debido al tratamiento con lovastatina durante la diferenciación de las moDC tenía como consecuencia la reducción en la síntesis de HO-1. Como se observa en la [Figura R15A](#), la expresión de HO-1 tras la activación con LPS era mucho menor en las stat-moDC que en las C-moDC. Se ha descrito que la activación de la transcripción de HO-1 inducida por el NO está mediada por la translocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2 (Srisook et al., 2005); por ese motivo, se analizó la localización subcelular del factor Nrf2 mediante microscopía confocal. En las C-moDC la incubación con LPS durante 16 horas inducía la translocación al núcleo de Nrf2, necesaria para activar la síntesis de HO-1. Sin embargo, en la stat-moDC el factor Nrf2 no se localizaba en el núcleo a ninguno de los tiempos analizados tras activación con LPS ([Figura R15B](#)). Por lo tanto, el defecto en la translocación al núcleo de Nrf2 que resulta de la inhibición de la síntesis de NO podría explicar la reducción observada en la inducción de HO-1 en las stat-moDC.

Se analizó también la expresión de HO-1 en moDC derivadas de ratones deficientes en el receptor de IFN de tipo I con el fin de determinar la contribución de la vía de IFNAR a la inducción de dicha enzima. Tras la estimulación con LPS, se observaba una importante reducción en la expresión de HO-1 en las moDC de ratones IFNAR KO, comparada con moDC de ratones WT ([Figura R15A](#)), lo que confirma que la inducción de HO-1, al igual que la de iNOS y NO, depende mayoritariamente de la vía iniciada por IFNAR. Por último, se analizó la expresión de HO-1 tras la activación con LPS en las stat-moDC derivadas de ratones IFNAR KO; en ausencia de IFNAR desaparecían las diferencias en la inducción de HO-1 entre las C-moDC y las stat-moDC ([Figura R15A](#)), lo que sugería que la inhibición en HO-1 observada en las stat-moDC de ratones WT era causada por el bloqueo de la lovastatina sobre la vía de IFNAR.

Figura R15

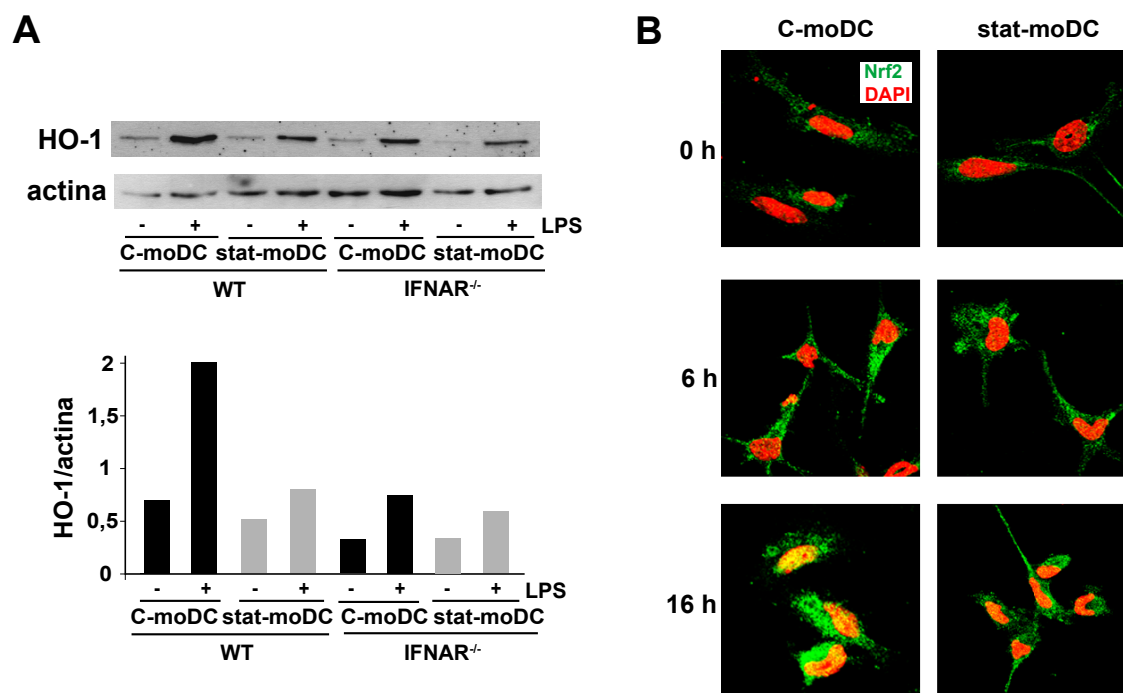


Figura R15. Expresión de HO-1 en las stat-moDC en respuesta a LPS. **A.** Expresión de HO-1 por western blot en C-moDC y stat-moDC de ratones WT e IFNAR^{-/-} estimuladas durante 16 horas con LPS. La cuantificación de la síntesis de HO-1 se llevó a cabo analizando la relación HO-1/actina con el programa Adobe Photoshop. **B.** Translocación nuclear de Nrf-2 en las C-moDC y stat-moDC estimuladas durante 6 y 16 horas con LPS. Mediante microscopía confocal se analizó la expresión de Nrf-2 (verde), utilizando para el marcaje de los núcleos (rojo) el colorante fluorescente DAPI, que se une al DNA.

Respuesta de las stat-moDC frente al estrés oxidativo inducido por LPS

Se ha demostrado en modelos animales que la ausencia de la enzima HO-1 se traduce en un estado inflamatorio crónico que se agrava con la edad (Poss and Tonegawa, 1997). Por otro lado, en modelos de isquemia cardiaca, inflamación pulmonar e hipertensión, la sobre-expresión de HO-1 tiene un potente efecto citoprotector (Minamino et al., 2001) (Otterbein et al., 1999). En base a estos antecedentes, decidimos investigar si la reducción en la síntesis de HO-1 observada en las stat-moDC afectaba a la capacidad de la célula para protegerse frente al estrés oxidativo.

Para ello, se analizó la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las moDC a distintos tiempos tras la estimulación con LPS, utilizando el reactivo CM-H₂DCFDA, que al ser oxidado por los radicales presentes dentro de la célula genera un compuesto fluorescente que se puede detectar por citometría de flujo. En las C-moDC estimuladas con LPS apenas se generaban radicales libres, lo que indicaba un correcto funcionamiento de los mecanismos de protección. Sin embargo, en las stat-moDC los niveles de ROS aumentaban

considerablemente respecto al nivel basal a partir de las 16 horas de estimulación con LPS (Figura R16A). Este resultado sugiere que la inhibición de HO-1 en las stat-moDC se traduce en un defecto en la capacidad citoprotectora frente a situaciones de estrés oxidativo. El análisis de la cinética de inducción de la enzima HO-1 a distintos tiempos de estimulación con LPS reveló que en las C-moDC la expresión de HO-1 podía ser detectada a las 16 horas de incubación con LPS (Figura R16B), lo que explica el aumento en el nivel de ROS observado en las stat-moDC a partir de las 16 horas de incubación con LPS y apoya que la citoprotección está mediada por HO-1.

Figura R16

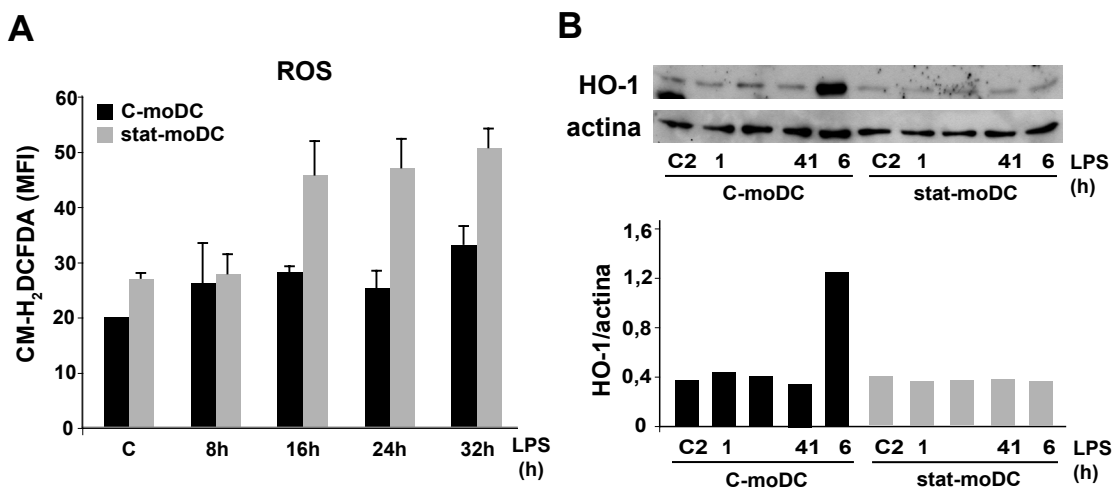


Figura R16. Capacidad citoprotectora de las stat-moDC estimuladas con LPS. A. Nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las C-moDC y stat-moDC a distintos tiempos de activación con LPS, analizado por citometría de flujo mediante el colorante fluorescente CM-H₂DCFDA. **B.** Cinética de la inducción de HO-1 analizada por western blot en C-moDC y stat-moDC en respuesta a LPS. La cuantificación de la síntesis de HO-1 se llevó a cabo analizando la relación HO-1/actina con el programa Adobe Photoshop.

Regulación del metabolismo del óxido nítrico en las moDC durante la infección por *Listeria monocytogenes*

Con el objetivo de determinar si el defecto observado en el metabolismo del óxido nítrico en las moDC diferenciadas *in vitro* en presencia de lovastatina ocurría también *in vivo*, decidimos estudiar la respuesta inmunológica en un modelo de infección con *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* es una bacteria intracelular que se transmite por la ingestión de alimentos contaminados, como productos sin pasteurizar o carnes no cocinadas completamente y cuya ruta natural de infección es a través del tracto gastrointestinal (Bibb et al., 1990). La *Listeria monocytogenes* es capaz de infectar a las células epiteliales del intestino en un proceso que requiere la interacción de la internalina A, expresada en la superficie de

la bacteria, con la E-cadherina, que se expresa en la superficie de las células epiteliales (Gaillard et al., 1991). Posteriormente, la *Listeria monocytogenes* atraviesa la barrera de células epiteliales y se disemina a través de la sangre a otros órganos, especialmente el hígado y el bazo. Después de la invasión celular, la *Listeria monocytogenes* escapa del fagosoma al citosol mediante la secreción de la listeriolisina O (LLO), una molécula que destruye la membrana fagosomal (Bielecki et al., 1990). Esta invasión del citosol induce una respuesta inmune inflamatoria y es responsable además de la inmunidad protectora de células T frente a la bacteria (Pamer, 2004). Aunque la infección natural con *Listeria monocytogenes* tiene lugar por vía gastrointestinal, la mayoría de los laboratorios han caracterizado la respuesta frente a esta bacteria utilizando modelos de infección por vía intravenosa o intraperitoneal, con el objetivo de estudiar la respuesta inmune durante una infección sistémica. En el desarrollo de este trabajo, los experimentos para estudiar la respuesta frente a *Listeria monocytogenes* se llevaron a cabo a partir de una infección por vía intravenosa. Se ha demostrado que durante la infección intravenosa con esta bacteria intracelular se genera una población de DC denominada TipDC, que está caracterizada por la producción de NO y $\text{TNF}\alpha$, factores solubles que desempeñan un papel fundamental en la eliminación del patógeno durante las primeras fases de la infección (Serbina et al., 2003). Las TipDC derivan de monocitos Ly-6C^{high} reclutados rápidamente al bazo como consecuencia de la inflamación asociada a la infección bacteriana, por un mecanismo dependiente de los receptores de quimioquinas CCR2 y CX₃CR1. El receptor CCR2 se encarga de la salida de los monocitos de la médula ósea (Serbina and Pamer, 2006), mientras que CX₃CR1 es responsable de la entrada de los monocitos al bazo (Auffray et al., 2009). En los últimos años se ha descrito la generación de TipDC en respuesta a multitud de infecciones, causadas tanto por bacterias como por parásitos: en un modelo de infección intraperitoneal con *Brucella melitensis* (Copin et al., 2007), durante la infección subcutánea con *Leishmania major* (De Trez et al., 2009), durante la infección intraperitoneal con *Trypanosoma brucei*, (Guilliams et al., 2009) y en la infección oral con *Salmonella typhimurium* (Rydstrom and Wick, 2007).

Analizamos la generación y función de las moDC (TipDC) durante la respuesta en el bazo a la infección con *Listeria* tras el tratamiento con lovastatina para determinar si existía un defecto en el metabolismo del NO de las TipDC, análogo al observado en las stat-moDC estimuladas con LPS *in vitro*. Para este fin, utilizamos un modelo experimental basado en el pretratamiento de ratones C57BL6 durante una semana mediante la inyección intraperitoneal diaria de 200 µg de lovastatina y la posterior administración por vía intravenosa de una dosis subletal (3000 bacterias) de la cepa 10403S de *Listeria monocytogenes*.

Análisis de las poblaciones celulares presentes en el bazo durante la infección por *Listeria monocytogenes*

En primer lugar, se determinó el número absoluto de células del bazo, así como de las principales poblaciones celulares leucocitarias presentes en el bazo: células T, células B y células NK. El análisis se realizó a día 0, es decir, tras el tratamiento durante una semana

con lovastatina, y a día 3, 6 y 9 después de la infección con *Listeria monocytogenes*. No se observaron diferencias significativas entre los ratones control y los tratados con lovastatina a ninguno de los tiempos de infección analizados (Figura R17).

Figura R17

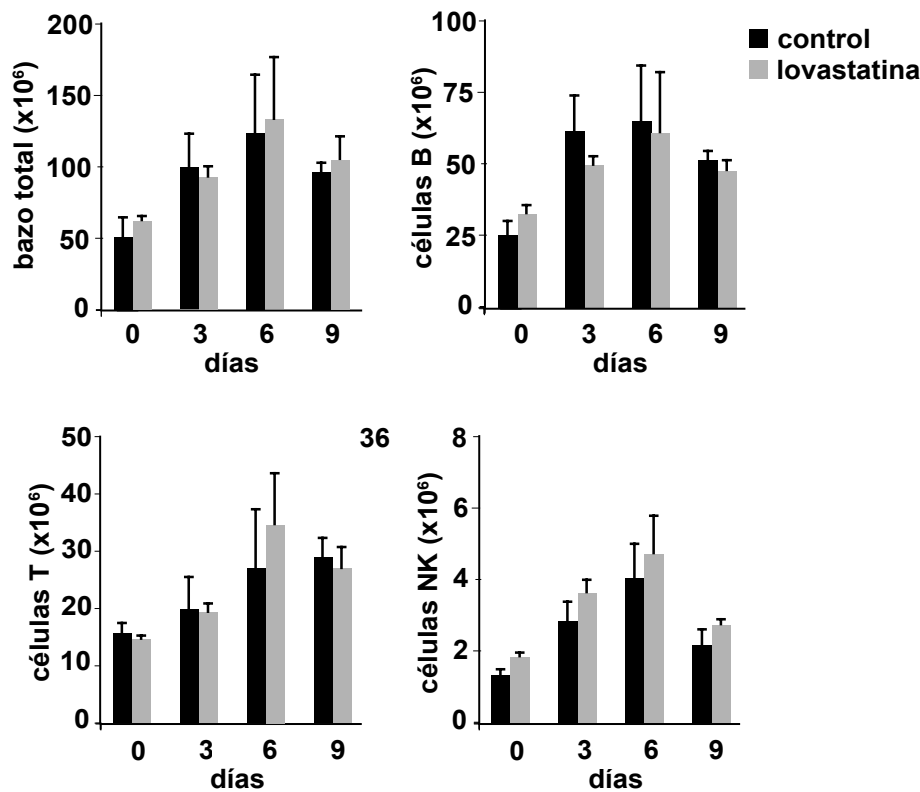


Figura R17. Efecto del tratamiento con lovastatina sobre las principales poblaciones celulares en el bazo durante la infección por *Listeria monocytogenes*. Número absoluto de células totales, células B, células T y células NK en el bazo de ratones pretratados durante una semana con lovastatina o PBS (control), sin infectar e infectados con *Listeria* a distintos tiempos. Se muestra un experimento representativo

Con el fin de analizar mediante citometría de flujo tanto los monocitos como las distintas subpoblaciones de DC durante la infección, se deplecionaron las células T y B mediante separación magnética y después se excluyeron las células NK y los granulocitos por citometría de flujo en base a la expresión de las moléculas CD49b y Ly-6G, respectivamente. La caracterización de estas poblaciones celulares se llevó a cabo a día 6 de la infección, ya que corresponde al punto máximo de la respuesta inflamatoria en el bazo. En el bazo de los ratones infectados con *Listeria monocytogenes* durante 6 días podíamos identificar 4 poblaciones en función de su nivel de expresión de las moléculas CD11c y CD11b: monocitos (CD11b^{high}/CD11c⁻), moDC (CD11b^{high}/CD11c^{int}), DC convencionales (cDC) (CD11b^{int}/CD11c^{high}), así como células CD11b^{low}/CD11c^{int} que incluían DC plasmacitoides (pDC) y precursores de DC (pre-DC) (Figura R18A). Comparado con ratones en reposo (sin infectar y sin tratar), observamos que la infección provocaba un fuerte reclutamiento de monocitos al bazo, que se traducían en

un incremento en el porcentaje de moDC. También observamos un importante aumento de la población correspondiente a pDC/pre-DC como consecuencia de la infección; sin embargo, el porcentaje de cDC permanecía constante al comparar ratones infectados con ratones en reposo (Figura 18A-B). Una vez caracterizada la respuesta en el bazo frente a *Listeria*, estudiamos el efecto del tratamiento con lovastatina sobre las poblaciones de monocitos/DC generadas durante la infección. Para ello, se calculó el número de células correspondiente a cada una de las subpoblaciones en los ratones control, en ratones tratados con lovastatina y también en ratones en reposo. El número absoluto de monocitos era similar entre ratones control y tratados con lovastatina (y muy superior al de ratones en reposo); sin embargo, el número de moDC en los ratones tratados con lovastatina era muy inferior al de los ratones control. Calculamos también el número absoluto de cDC y observamos que no había diferencias ni entre ratones infectados control y tratados con lovastatina ni entre ratones infectados y en reposo (Figura R18C).

Figura R18

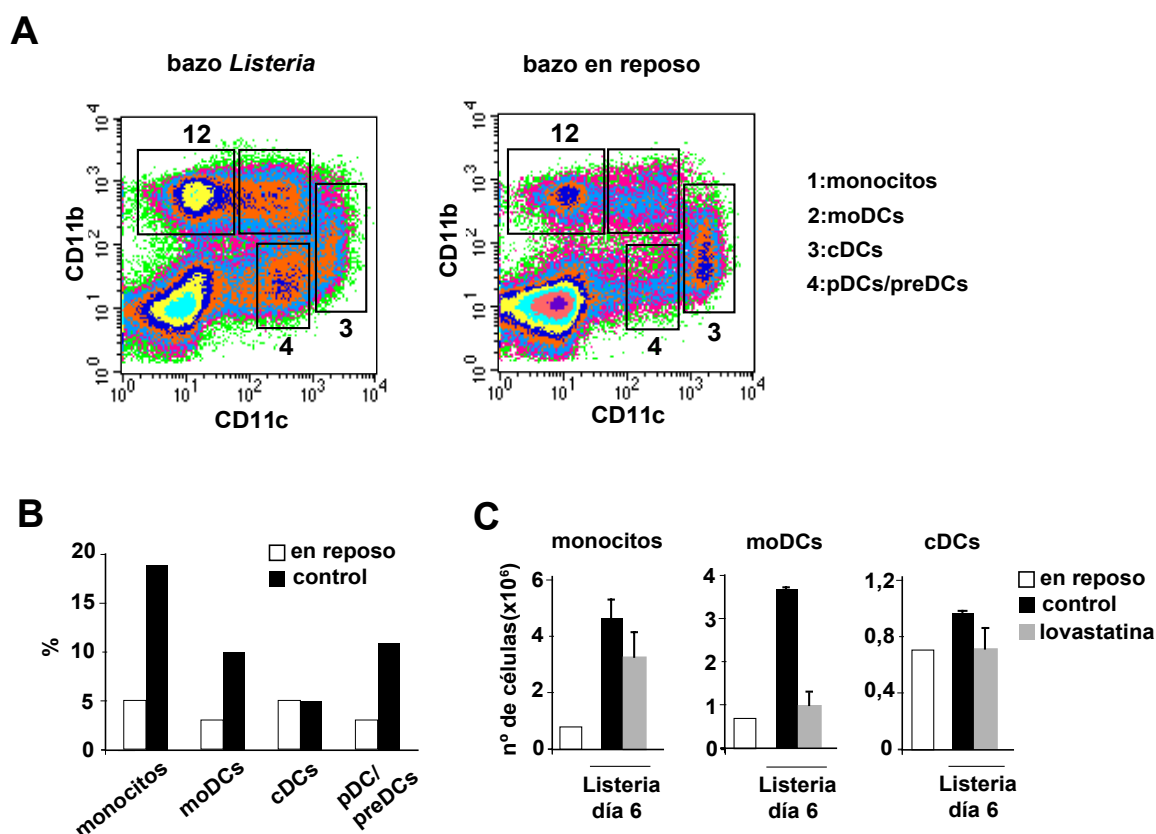
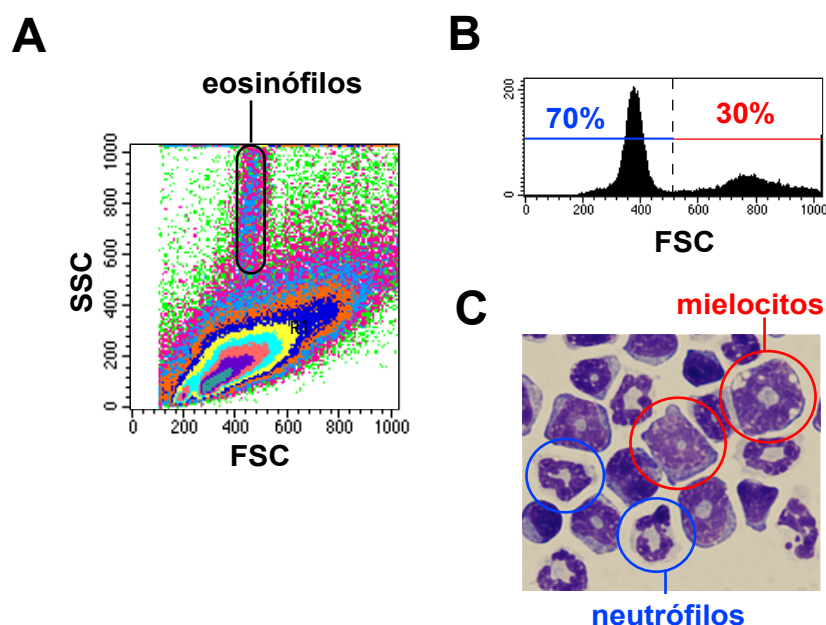


Figura R18. Caracterización de las poblaciones de monocitos/DC en el bazo durante la infección por *Listeria monocytogenes*. **A.** Caracterización fenotípica, en base a la expresión de CD11b vs CD11c, de las subpoblaciones de monocitos/DC en el bazo de ratones infectados con *Listeria* durante 6 días y de ratones en reposo (sin infectar y sin tratar), tras la depleción de células T y células B por separación magnética seguida de la exclusión de células NK y granulocitos mediante citometría de flujo. moDC: DC derivadas de monocitos; cDC: DC convencionales; pDC: DC plasmacitoides; preDC: precursores de DC. **B.** Porcentaje de monocitos, moDC, cDC y pDC/preDC en el bazo de ratones infectados con *Listeria* durante 6 días (control) y de ratones en reposo. **C.** Número absoluto de monocitos, moDC y cDC en el bazo de ratones pretratados con lovastatina o PBS (control) a día 6 de la infección con *Listeria*, así como de ratones en reposo.

El procesamiento llevado a cabo en el bazo de ratones infectados con *Listeria* permitió también la identificación y caracterización de las distintas subpoblaciones de granulocitos. Los eosinófilos presentaban un característico perfil de citometría de flujo al representar el tamaño celular (FSC, del inglés *Forward Scatter*) frente a la complejidad citoplásmica (SSC, del inglés *Side Scatter*), definido como $FSC^{int} SSC^{high}$ (Figura R19A). Los neutrófilos se definieron en base a la molécula Ly-6G, ya que se ha descrito que es un marcador específico para esta población (Fleming et al., 1993). Sin embargo, cuando analizamos las células Ly-6G⁺ observamos que se podían distinguir dos poblaciones en función del tamaño celular: células Ly-6G⁺FSC^{low} y células Ly-6G⁺FSC^{high}, que representaban el 70% y 30% de las células Ly-6G⁺, respectivamente (Figura R19B). Llevamos a cabo un análisis morfológico de las dos poblaciones tras el aislamiento por selección positiva de las células Ly-6G⁺ del bazo total. El análisis por el método Giemsa de las células Ly-6G⁺ fijadas mediante citocentrifugación (*citospin*) reveló que la fracción FSC^{low} presentaba la morfología característica de los neutrófilos, con el núcleo lobulado con la cromatina compacta. Por el contrario, las células FSC^{high} tenían un núcleo regular con la cromatina muy descondensada (Figura R19C), característico de células inmaduras, lo que indica que probablemente correspondan a mielocitos, es decir, a precursores de los neutrófilos. Existe también la posibilidad de que estas células sean neutrófilos activados, ya que como se verá en el siguiente apartado tienen la capacidad de producir NO. Desde el punto de vista fenotípico, los mielocitos expresaban niveles mayores de Ly-6C y F4/80 que los neutrófilos (Figura R19D).

Figura R19



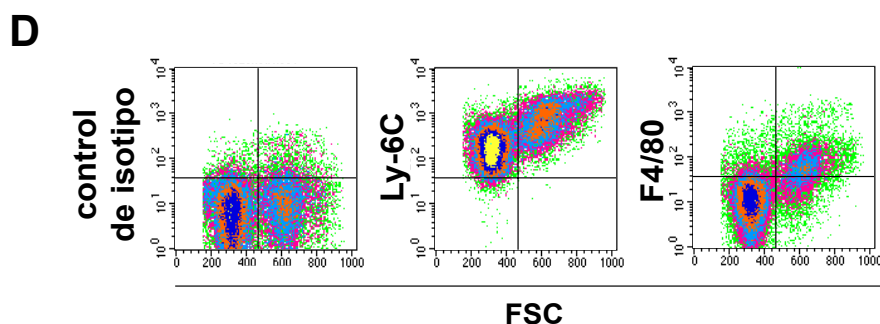


Figura R19. Caracterización de las poblaciones de granulocitos en el bazo durante la infección por *Listeria monocytogenes*. **A.** Definición de los eosinófilos mediante citometría de flujo, en base a la expresión de los parámetros tamaño (FSC) vs complejidad (SSC), en el bazo de ratones infectados con *Listeria* durante 6 días. **B.** Análisis por citometría de flujo de la proporción de las dos poblaciones incluidas en las células Ly-6G⁺ en el bazo de ratones infectados con *Listeria* durante 6 días, en base al tamaño (FSC). **C.** Tinción Giemsa de una *cytospin* de células Ly-6G⁺ aisladas mediante separación magnética del bazo de ratones infectados con *Listeria* durante 6 días; se muestra la morfología de los neutrófilos (círculos azules) y de los mielocitos (círculos rojos). **D.** Expresión de Ly-6C y F4/80, frente al control de isotipo, de los neutrófilos y los mielocitos en el bazo a día 6 de la infección con *Listeria*.

Células productoras de NO en el bazo durante la infección con *Listeria monocytogenes*

Para determinar qué tipos celulares estaban implicados en la producción de NO en el bazo durante la infección por *Listeria monocytogenes* se analizó la expresión de iNOS en las distintas poblaciones celulares esplénicas, particularmente en las subpoblaciones de DC y de origen monocítico. Se utilizó esta aproximación experimental para estimar el potencial de producción de NO, ya que observamos que existía una clara correlación entre la inducción de iNOS y la cantidad de NO producida por las moDC en respuesta a LPS (Figura R20).

Figura R20

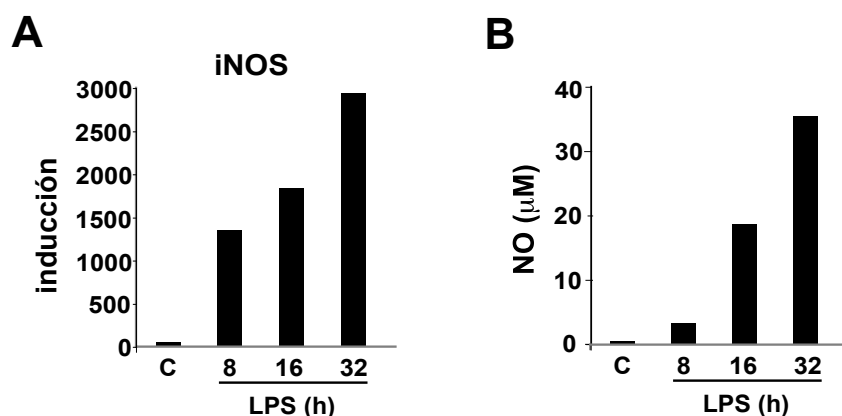


Figura R20. Correlación entre iNOS y NO en las moDC. **A.** Expresión de iNOS por qPCR en moDC sin estimular y a distintos tiempos de activación con LPS. **B.** Producción de NO, detectada mediante una variante del reactivo de Griess, en moDC sin estimular y a distintos tiempos de activación con LPS. Se muestra un experimento representativo

El análisis de iNOS se realizó a día 6 de la infección con *Listeria monocytogenes* mediante marcaje intracelular y posterior detección por citometría de flujo. En primer lugar determinamos la expresión de iNOS en los monocitos y en las distintas subpoblaciones de DC. Observamos que solamente las moDC eran capaces de sintetizar iNOS, y de una forma muy eficiente, ya que aproximadamente un 15 % de las células expresaban dicha enzima. No se detectó iNOS ni en los monocitos ni en las otras poblaciones de DC, que incluían cDC, pDC y pre-DC (Figura R21A-B).

Analizamos también la expresión de iNOS en las otras poblaciones celulares presentes en el bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes* durante 6 días. No se detectó iNOS en células T, células B ni células NK. Sin embargo, el análisis de iNOS en los granulocitos reveló que cerca de un 4% de los eosinófilos y el 8% de los mielocitos eran iNOS⁺, mientras que no se detectó iNOS en la población de neutrófilos (Figura R21B).

Una vez definidas en ratones control las principales poblaciones celulares capaces de producir NO durante la infección con *Listeria monocytogenes*, analizamos la expresión de iNOS en el bazo de ratones tratados con lovastatina e infectados con *Listeria*. Como se observa en la Figuras R21A-B, el porcentaje de moDC, eosinófilos y mielocitos que expresaban iNOS era mucho menor en el caso de los ratones tratados con lovastatina que en los ratones control. Esta inhibición de iNOS en las moDC generadas en el bazo durante la infección con *Listeria* era una consecuencia del tratamiento de los ratones con lovastatina y confirmaba, en un modelo *in vivo* de infección, el defecto observado en el metabolismo del NO en las moDC diferenciadas *in vitro* en presencia de lovastatina y activadas con LPS. En dichos experimentos *in vitro*, la señalización a través de TLR4 sobre las moDC inducía la producción de IFN β , que señalizaba de forma autocrina a través de IFNAR. La lovastatina inhibía parcialmente la señalización iniciada por IFNAR, lo que se traducía en una activación defectuosa de iNOS y, por lo tanto, en una menor producción de NO. Por otro lado, los experimentos de infección *in vivo* con *Listeria monocytogenes* han revelado que en las moDC la lovastatina afecta negativamente a la expresión de iNOS inducida por un ligando de TLR distinto a TLR4. En este sentido se ha descrito que la respuesta inmune innata frente a *Listeria*, es decir, la producción de factores solubles como TNF α y NO, depende mayoritariamente de MyD88, lo que implica la participación de un TLR (Edelson and Unanue, 2002).

En base al porcentaje de células que expresaban iNOS y al número absoluto de células a día 6 de la infección, calculamos el número de células iNOS⁺ dentro de cada una de las 3 poblaciones capaces de expresar esta enzima (moDC, mielocitos y eosinófilos) y observamos que las moDC eran las principales productoras de NO en el bazo durante la infección con *Listeria* (Figura R21C). Como en los ratones tratados con lovastatina había una importante reducción tanto en el número de moDC (Figura R18C) como en el porcentaje de moDC iNOS⁺ (Figura R21B), el número absoluto de moDC productoras de NO era muy inferior al de ratones control (Figura R21C).

Figura R21

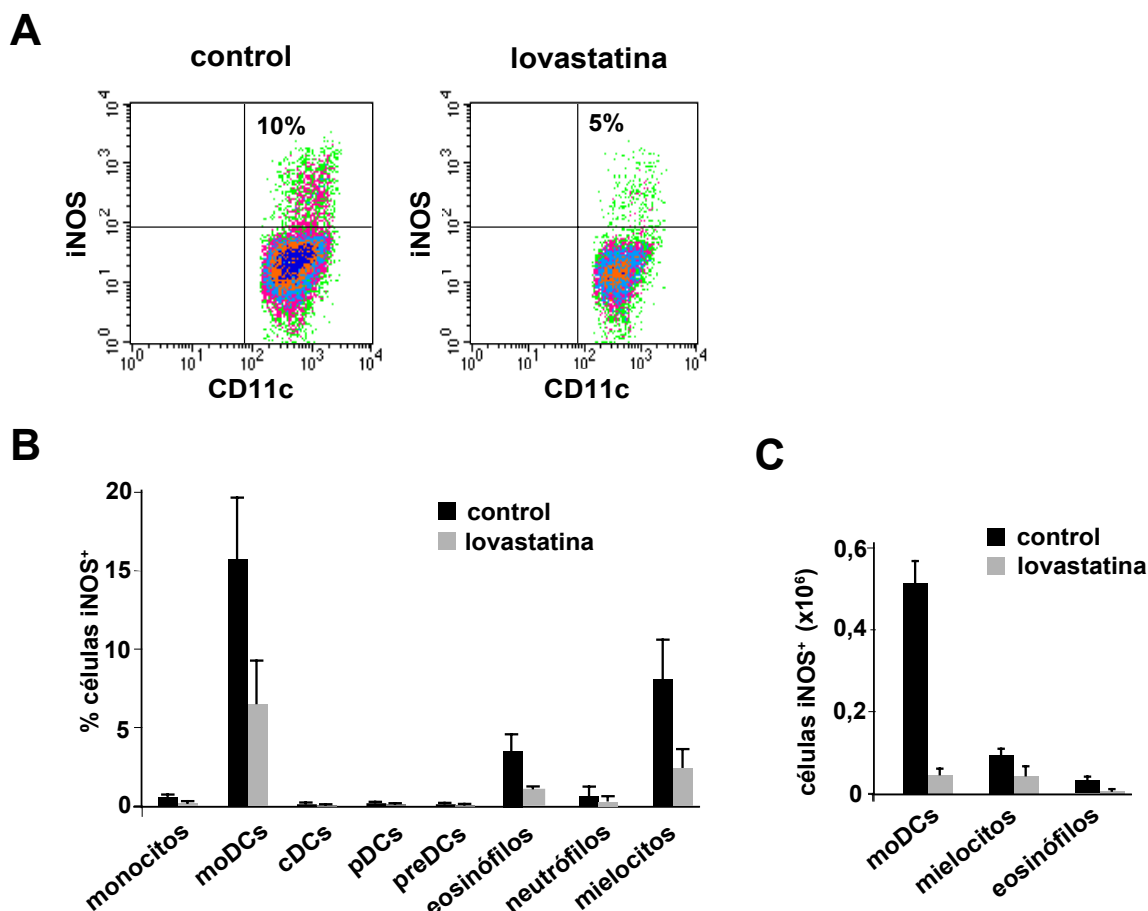


Figura R21. Efecto del tratamiento con lovastatina sobre la expresión de iNOS en el bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes*. **A.** Expresión de iNOS por las moDC en el bazo de ratones pretratados durante una semana con lovastatina o PBS (control) e infectados durante 6 días con *Listeria*, analizado por citometría de flujo. **B.** Porcentaje de células iNOS⁺ dentro de las poblaciones de monocitos, DC y granulocitos en el bazo de ratones pretratados durante una semana con lovastatina o PBS (control) e infectados durante 6 días con *Listeria*. **C.** Número absoluto de células iNOS⁺ dentro de las poblaciones de moDC, mielocitos y eosinófilos en el bazo de ratones pretratados durante una semana con lovastatina o PBS (control) e infectados durante 6 días con *Listeria*.

Eficiencia en la eliminación de la bacteria en el bazo de ratones infectados con *Listeria* y pretratados con lovastatina

Como se ha comentado anteriormente, las moDC generadas en el bazo en nuestro modelo de infección con *Listeria* son equivalentes a las TipDC descritas en 2003 por el grupo de Eric Pamer (Serbina et al., 2003); dichas células están especializadas en la producción de TNF α y NO y son fundamentales para la eliminación del patógeno en las primeras fases de la infección. Por este motivo, nos planteamos si la dramática reducción en el número de moDC iNOS⁺ observada en los ratones tratados con lovastatina tenía como consecuencia un defecto en la eliminación de la bacteria. Para confirmar esta hipótesis, determinamos la carga bacteriana

en el bazo de ratones control a distintos tiempos de la infección con *Listeria* y la comparamos con la de ratones tratados con lovastatina. Contrariamente a lo esperado, el pretratamiento con lovastatina resultaba en una mejor eliminación de la bacteria, ya que la cantidad de bacterias en el bazo de los ratones tratados con lovastatina era inferior a la de los ratones control, a los dos tiempos analizados (Figura R22A).

Encontramos una posible explicación para este fenómeno en el fuerte incremento en la población de neutrófilos del bazo provocado por el tratamiento con lovastatina, que observábamos incluso en los ratones no infectados (Figura R22B, día 0). Se ha demostrado que los neutrófilos tienen un papel esencial en la eliminación de la bacteria durante la infección con *Listeria* (Rogers and Unanue, 1993) (Czuprynski et al., 1994). Por lo tanto, el aumento en el número de neutrófilos mediado por la lovastatina podría contrarrestar el defecto en el número de moDC productoras de NO, dando como resultado una eliminación más eficaz de la bacteria en los ratones pretratados con lovastatina.

Figura R22

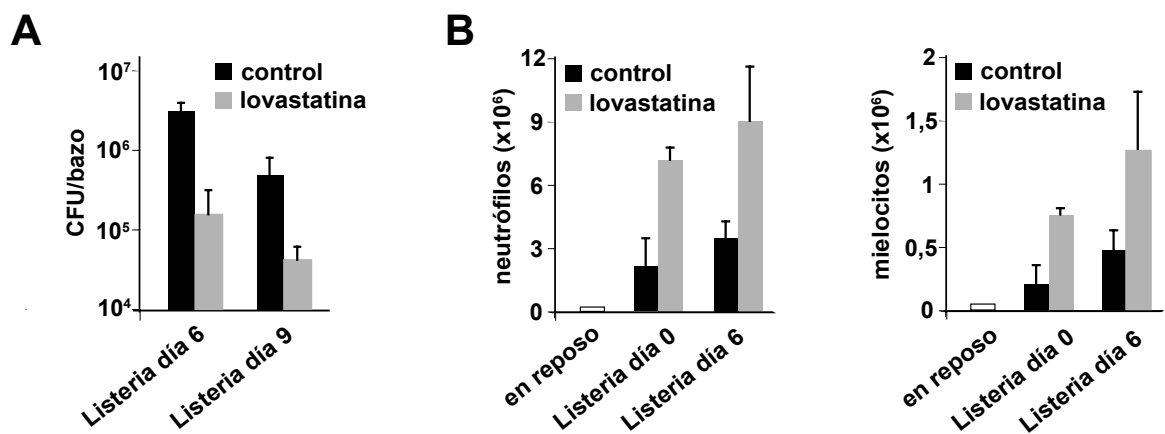


Figura R22. Efecto del tratamiento con lovastatina sobre la replicación de la bacteria en el bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes*. **A.** Carga bacteriana en el bazo de ratones pretratados durante una semana con lovastatina o PBS (control) a días 6 y 9 de la infección por *Listeria*. **B.** Número absoluto de neutrófilos y mielocitos en el bazo de ratones sin infectar (en reposo) o pretratados durante una semana con lovastatina o PBS (control) a días 0 y 6 de la infección por *Listeria*.

Otra explicación sería que la lovastatina provocase un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias por las moDC del bazo como consecuencia de la activación mediada por *Listeria*, al igual que ocurre en las stat-moDC estimuladas *in vitro* con LPS, lo que ayudaría a mejorar la respuesta inmunológica frente al patógeno. Sin embargo, esta hipótesis parece poco probable, en base al resultado de la infección *in vitro* de las moDC con *Listeria*. En dicho experimento, diferenciamos moDC en presencia de lovastatina durante 48 horas y las infectamos con *Listeria monocytogenes* durante 1 o 4 horas, a una relación moDC:bacteria de 1:10 o 1:20.

Posteriormente, cambiamos el medio y dejamos las células en cultivo durante 16 horas más. Al día siguiente recogimos el sobrenadante y analizamos la producción de citoquinas inducida por la bacteria. Como se observa en la [Figura R23A](#), las stat-moDC infectadas *in vitro* con *Listeria* producían una cantidad similar de IL-12 e IL-6 que las C-moDC. Este resultado sugiere que la presencia de lovastatina durante la infección *in vivo* con *Listeria* no se traduce en un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias por las moDC del bazo. Es importante señalar que las stat-moDC infectadas *in vitro* con *Listeria monocytogenes* producían menos NO que las C-moDC en todas las condiciones analizadas, es decir, independientemente del tiempo de incubación con *Listeria* y el ratio moDC:bacteria ([Figura R23B](#)). Esta inhibición en la producción de NO está de acuerdo con los datos de las stat-moDC estimuladas con LPS ([Figura R10A-B](#)) y las moDC generadas en el bazo durante la infección con *Listeria monocytogenes* ([Figura R21B](#)), y confirma que la lovastatina regula negativamente el metabolismo del NO en las moDC activadas.

Figura R23

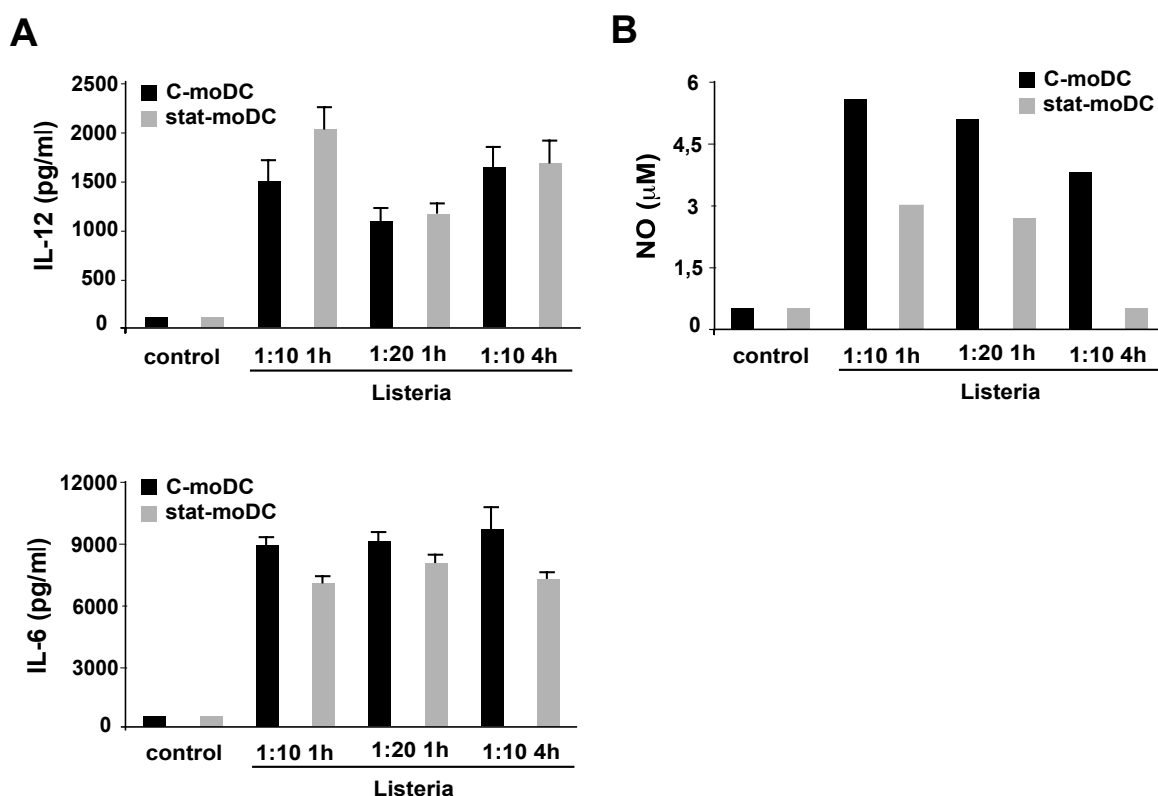


Figura R23. Infección *in vitro* de stat-moDC con *Listeria monocytogenes*. **A.** Producción de IL-6 e IL-12 p70 por C-moDC y stat-moDC, analizada por ELISA, 16 horas después de la infección durante 1 o 4 horas con *Listeria monocytogenes*, en una relación moDC:bacteria de 1:10 o 1:20. **B.** Producción de NO por C-moDC y stat-moDC, analizada mediante una variante del reactivo de Griess, 16 horas después de la infección durante 1 o 4 horas con *Listeria monocytogenes*, en una relación moDC:bacteria de 1:10 o 1:20. Se muestra un experimento representativo.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado el efecto del tratamiento con lovastatina sobre la diferenciación y función de las células dendríticas derivadas de monocitos (moDC). En una primera fase de experimentos *in vitro*, se analizó la respuesta de las moDC diferenciadas en presencia de lovastatina (stat-moDC) tras la activación con LPS, un ligando de TLR4. Por un lado, las stat-moDC activadas con LPS producían mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias, así como de IFN β . Por otro lado, la expresión de moléculas de coestimulación asociada al proceso de maduración de las DC era menor en el caso de las stat-moDC. Esta disminución en los niveles de las moléculas de coestimulación se traducían en una menor capacidad de las stat-moDC para estimular células T antígeno-específicas *in vitro*, aunque cuando la activación de las células T antígeno-específicas ocurría *in vivo* las stat-moDC estimulaban a las células T de forma correcta. Por último, se estudió la señalización a través de TLR4 en las stat-moDC activadas con LPS y la señalización autocrina inducida por el IFN β sintetizado tras la activación de TLR4, a través del receptor del IFN de tipo I (IFNAR). La lovastatina regulaba positivamente la vía de TLR-4, induciendo una mayor activación de p38 MAPK, fenómeno que se traducían en un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias e IFN β . Por el contrario, la lovastatina regulaba negativamente la vía de IFNAR, inhibiendo la expresión de IRF-1, lo que conllevaba una reducción tanto en la síntesis de iNOS como en la producción de NO en las stat-moDC estimuladas con LPS. Como consecuencia de esta inhibición en el metabolismo del NO, la activación de la molécula citoprotectora HO-1 era defectuosa en las stat-moDC. La utilización de ratones deficientes para IFNAR reveló que tanto la activación de iNOS/HO-1 como la producción de NO en las moDC estimuladas con LPS estaban controladas mayoritariamente por la señalización autocrina a través de IFNAR. Los resultados obtenidos en estos experimentos *in vitro* con las stat-moDC fueron posteriormente validados *in vivo* en un modelo de infección con *Listeria monocytogenes*. Dichos experimentos *in vivo* confirmaron que el tratamiento con lovastatina de forma previa a la infección con esta bacteria bloqueaba la activación de iNOS en las moDC generadas en el bazo en las primeras fases de la respuesta inmune frente al patógeno.

Las estatinas son moléculas con la capacidad de inhibir la síntesis endógena de colesterol y regular el metabolismo de los lípidos. Por ello, son uno de los principales fármacos utilizados en todo el mundo para el tratamiento de la hipercolesterolemia y de enfermedades cardiovasculares (Maron et al., 2000). Recientemente, se ha descrito que las estatinas son capaces de modular la respuesta del sistema inmunológico, principalmente por su efecto inhibitorio sobre la prenilación de proteínas implicadas en la señalización celular, como las Rho y las Ras GTPasas (Greenwood et al., 2006). Debido al importante papel de dichas proteínas en multitud de procesos celulares como la expresión génica, la regulación del citoesqueleto de actina, la proliferación, la apoptosis y la migración, esta capacidad reguladora de las estatinas sobre las GTPasas pequeñas podría afectar al funcionamiento de la célula durante la respuesta inmune frente a patógenos o en situaciones de inflamación. Por otro lado, teniendo en cuenta

que los tratamientos con estatinas duran largos períodos de tiempo, el estudio de los efectos secundarios a largo plazo que se pueden derivar de la administración continuada de este fármaco tiene especial importancia.

Durante el desarrollo de este trabajo, nos hemos centrado en el efecto de la lovastatina sobre una de las poblaciones principales del sistema inmunológico, las células dendríticas (DC), especializadas en la presentación de antígenos a las células T responsables de la inducción de respuestas frente a patógenos y tumores (Ardavin et al., 2004; Coquerelle and Moser). Estudios previos realizados *in vitro* sobre el efecto de las estatinas en la activación de DC han concluido que el tratamiento con estatinas promueve la producción de citoquinas proinflamatorias por las DC y afecta a la capacidad de éstas para estimular células T, tanto en modelos experimentales de ratón (Sun and Fernandes, 2003) como en el sistema humano (Yilmaz et al., 2006). En el presente estudio, hemos abordado estos aspectos y otros de la activación de las DC tratadas con estatina y hemos analizado el efecto del tratamiento con estatinas sobre las DC durante una respuesta inmune *in vivo*.

De las diferentes subpoblaciones de DC, decidimos estudiar las que se generan *de novo* durante las reacciones inflamatorias y los procesos infecciosos, que derivan mayoritariamente de monocitos reclutados a los sitios de inflamación. Estas moDC inflamatorias reemplazan rápidamente a las DC que se encuentran en reposo tanto en la periferia como en los órganos linfoides secundarios, y tienen un papel fundamental en la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, frente a bacterias, virus y parásitos (Dominguez and Ardavin, 2010). Con respecto al papel de las moDC en la respuesta inmune adaptativa, se ha descrito que las moDC tienen la capacidad de activar células T CD4⁺ antígeno-específicas en un modelo de infección subcutánea con *Leishmania major* (Leon et al., 2007), durante la infección en la mucosa vaginal con el virus HSV-2 (Iijima et al., 2007) y en un modelo de infección intranasal con el virus de la gripe (Nakano et al., 2009). Además se ha propuesto que las moDC son las responsables de cross-presentar antígenos a células T CD8⁺ antígeno-específicas durante la inmunización con OVA en la mucosa bucal (Le Borgne et al., 2006) y que son capaces de inducir respuestas de células T CD8⁺ frente a virus en un modelo de infección en el pulmón con el virus de la gripe (Aldridge et al., 2009). Recientemente, se ha demostrado que las moDC también tienen un papel en la respuesta inmune innata frente a distintos patógenos, debido a su capacidad para producir factores solubles como el TNF α y el NO. En las primeras etapas de la infección, las moDC (denominadas TipDC) generadas *de novo* liberan TNF α y NO, ayudando de forma importante a la eliminación del patógeno y, por lo tanto, a la resolución favorable de la infección. Las TipDC se identificaron por primera vez durante la infección con *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003), aunque posteriormente se han descrito durante la infección por otras bacterias como *Brucella melitensis* (Copin et al., 2007), durante infecciones causadas por parásitos como *Leishmania major* (De Trez et al., 2009) y *Trypanosoma brucei* (Guilliams et al., 2009), o por virus como el virus de la gripe (Aldridge et al., 2009).

Respuesta de las stat-moDC a la activación por LPS

Hemos analizado la respuesta a LPS de las DC tras la diferenciación de los monocitos en presencia de lovastatina, a diferencia de estudios previos sobre el efecto de las estatinas en la activación de las DC, en los que analizaban el efecto del tratamiento con lovastatina sobre DC ya diferenciadas. En base a los ensayos de titulación comprobamos que los monocitos son particularmente sensibles al tratamiento con lovastatina, ya que concentraciones superiores a 1 μ M provocaban una importante disminución en la viabilidad celular. No observamos este fenómeno en el tratamiento con lovastatina de las moDC ya diferenciadas, que eran viables a concentraciones muy superiores, incluso de 10 μ M. Este resultado tiene especial relevancia *in vivo*, puesto que los monocitos son los principales precursores de las DC inflamatorias. Teniendo en cuenta la toxicidad de la lovastatina sobre los monocitos cultivados *in vitro*, el incremento en la muerte celular de los monocitos por el tratamiento con lovastatina conllevaría una disminución en la población de moDC inflamatorias y, por lo tanto, afectaría al desarrollo de las respuestas inmunes frente a patógenos. Estas funciones incluyen, como se ha comentado anteriormente, la producción de factores solubles con actividad microbiciida y la capacidad de activación de células T CD4⁺ antígeno-específicas, así como la cross-presentación a células T CD8⁺, durante infecciones causadas por bacterias, virus o parásitos (Dominguez and Ardavin, 2010). Con respecto a la toxicidad *in vivo* de la lovastatina sobre los monocitos, los experimentos de infección con *Listeria monocytogenes* en animales tratados con lovastatina revelan que existe una disminución en el número de moDC en el bazo, aunque este punto se tendrá en cuenta más adelante al discutir el efecto de la lovastatina en un modelo de infección *in vivo*.

Los experimentos *in vitro* de las stat-moDC estimuladas con LPS, ligando de TLR4, indican que la presencia de lovastatina durante la diferenciación de las moDC afecta a la expresión de las moléculas de coestimulación inducida tras la activación con LPS, así como a la capacidad de estimulación de células T antígeno-específicas *in vitro*. Sin embargo, la activación *in vivo* de células T antígeno-específicas por las stat-moDC es correcta. La deficiente expresión de moléculas de coestimulación tras la activación con LPS de las moDC diferenciadas en presencia de lovastatina estaba en consonancia con una menor capacidad para estimular células T transgénicas OT-II *in vitro*. Las células T antígeno-específicas que habían sido estimuladas por las stat-moDC producían menores niveles de IL-2 e IFN γ , presentaban una menor expresión de CD25 y un menor nivel de proliferación. Este resultado está de acuerdo con datos previos obtenidos en BMDC de ratón en un ensayo de MLR (Sun and Fernandes, 2003). Sin embargo, este defecto en la capacidad de estimulación de células T por las stat-moDC no se observaba cuando la activación de las células T ocurría *in vivo*. El análisis de la estimulación *in vivo* de células T antígeno-específicas se realizó en el ganglio poplíteo de ratones que habían recibido células T OT-II por vía intravenosa y stat-moDC, pulsadas con

la proteína OVA y estimuladas con LPS, por vía subcutánea. En estas condiciones, tanto la proliferación como la activación de las células T estimuladas con stat-moDC era similar a la de células T activadas con moDC control. La discrepancia en la capacidad de estimulación de células T antígeno-específicas por las stat-moDC entre los experimentos *in vitro* y los ensayos realizados *in vivo*, sugiere que el entorno inflamatorio inducido en la dermis tras la inyección subcutánea de las moDC contrarresta la defectuosa expresión de moléculas de coestimulación de las moDC diferenciadas en presencia de lovastatina, permitiendo su migración al ganglio linfático drenante y la correcta estimulación de las células T.

Por lo que respecta a la producción de citoquinas inducida por la estimulación con LPS de las stat-moDC, nuestros datos demuestran que el tratamiento con lovastatina durante la diferenciación de las moDC promueve un aumento en la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 e IL-12, así como de IFN β . En este mismo sentido, se ha descrito en BMDC de ratón que el tratamiento con lovastatina aumenta la producción de IL-12, IL-6 y TNF α en respuesta a LPS (Sun and Fernandes, 2003), y en macrófagos peritoneales de ratón estimulados con LPS que la simvastatina promueve una mayor síntesis de IL-12 p40 (Matsumoto et al., 2004). Además, se ha demostrado que el tratamiento con simvastatina en moDC humanas previamente a la activación con LPS induce una mayor producción de IL-6, IL-8, IL-12 y TNF α (Yilmaz et al., 2006).

Los experimentos de estimulación *in vitro* de las stat-moDC con LPS ponen de manifiesto además que la síntesis de óxido nítrico (NO) a través de TLR4 está afectada por la presencia de lovastatina durante la diferenciación de las moDC. Dicha inhibición de la producción de NO dentro de la célula tras la activación de las stat-moDC con LPS estaba asociada a su vez con un defecto en la inducción de la enzima hemo-oxigenasa 1 (HO-1). Esta menor expresión de HO-1 estaba correlacionada con una menor capacidad de protección de las células frente al estrés oxidativo generado por el LPS, que se manifestaba en un incremento en los niveles de ROS. Dicho resultado concuerda con el papel citoprotector de la HO-1, es decir, su capacidad para generar moléculas que ayudan a proteger la célula en situaciones de estrés oxidativo o patologías (Otterbein et al., 2003). Por lo tanto, la inhibición en la síntesis de HO-1 por la presencia de lovastatina durante la diferenciación de las moDC podría conducir a un defecto en la citoprotección frente a los radicales libres, que comprometería la viabilidad de las células en situaciones de infección o inflamación.

Contribución de la señalización autocrina por IFNAR a la producción de citoquinas y al metabolismo del NO en las moDC activadas por LPS

El estudio de los efectos de la lovastatina sobre la estimulación con LPS de las stat-moDC nos condujo a analizar en detalle la señalización iniciada por TLR-4 en las moDC. La señalización iniciada por TLR-4 consta de dos vías dependientes de los factores MyD88 y TRIF, que inducen la transcripción de citoquinas proinflamatorias e IFN β , respectivamente (Kawai and Akira, 2007). A su vez la producción de IFN β inicia la señalización de forma autocrina a través de IFNAR. Mediante la utilización de ratones deficientes para el receptor de IFN de tipo I (IFNAR) hemos llegado a la conclusión de que en las moDC estimuladas con LPS la producción de IL-1 β , IL-6 e IL-12, así como de IFN β , depende de la vía de TLR-4. Además esta estrategia ha permitido demostrar que la síntesis de IL-12 en las moDC está controlada de forma similar por la vía de TLR-4 y la vía de IFNAR. Finalmente, los experimentos con ratones IFNAR KO han revelado que la inducción de iNOS y de HO-1 en respuesta a LPS en las moDC depende mayoritariamente de la vía de IFNAR, aunque requiere la contribución de TLR-4.

La similar producción de IFN β en respuesta a LPS por las moDC de ratones deficientes para IFNAR y de ratones WT pone de manifiesto que la síntesis de IFN β depende exclusivamente de TLR-4. Esta conclusión implica que en las moDC no existe una segunda oleada de producción de IFN de tipo I inducida por la señalización autocrina a través de IFNAR. Dicho resultado difiere de lo demostrado para otras subpoblaciones de DC. En experimentos con BMDC diferenciadas en presencia de GM-CSF y TNF α y estimuladas con LPS, la producción de IFN β en ausencia de IFNAR estaba muy reducida. En base a este resultado, los autores establecieron que la activación a través de TLR4 de las BMDC inducía un *loop* autocrino de IFN de tipo I (Gautier et al., 2005). Por otro lado, mediante la estimulación con CpG (ligando de TLR9) de DC plasmacitoides (pDC) aisladas de ratones deficientes para el factor de transcripción IRF7, se demostró que la producción de IFN de tipo I por las pDC en respuesta a TLR9 dependía de IRF-7 (Honda et al., 2005). Además se ha propuesto que las DC convencionales (cDC) y las BMDC estimuladas secuencialmente con IFN β y LPS son capaces de producir más cantidad de IFN de tipo I a través de IRF-7 (Richez et al., 2009; Sakaguchi et al., 2003). Por este motivo, nos planteamos que la ausencia de una segunda oleada de IFN de tipo I en las moDC podría ser debida a un defecto en la síntesis de IRF-7. Contrariamente a lo esperado, el análisis de la expresión de IRF-7 en las moDC estimuladas con LPS reveló que las moDC eran capaces de sintetizar IRF-7 a nivel de mRNA a través de IFNAR. Sin embargo, el nivel de expresión de IRF-7 en las moDC era muy inferior al observado en las pDC, lo que podría explicar la incapacidad de las moDC estimuladas con LPS para sintetizar IFN β a través de la señalización inducida por IFNAR. Existe también la posibilidad de que el mRNA de IRF-7 sintetizado por las moDC no

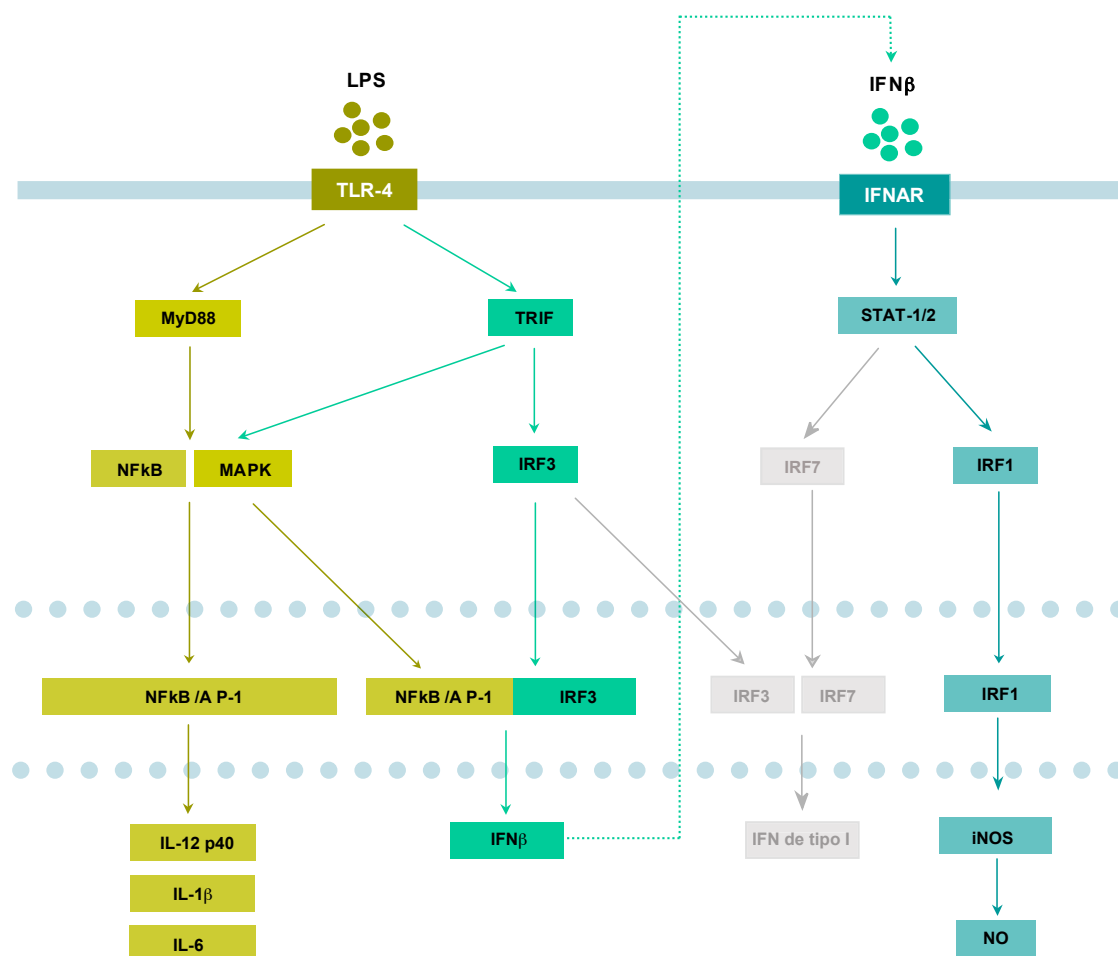
dé lugar a proteína o que la proteína no se active correctamente, ya que se ha descrito que la translocación de IRF-7 al núcleo está inducida por su fosforilación en el citoplasma (Marie et al., 1998). El modelo propuesto para la producción de IFN de tipo I en las moDC a través de TLR-4 se muestra en la [Figura D1](#).

En segundo lugar, el análisis de la producción de IL-12 por las moDC derivadas de ratones IFNAR KO ha demostrado que la síntesis de IL-12 p70 en respuesta a LPS está controlada tanto por TLR-4 como por IFNAR, ya que la síntesis de la subunidad p40 depende casi exclusivamente de la vía de TLR-4, mientras que la señalización por TLR-4 y por IFNAR contribuyen de forma similar a la síntesis de la subunidad p35. Este resultado contrasta con el concepto ampliamente aceptado de que en DC activadas mediante receptores TLR la síntesis de IL-12 p35 está inducida por la señalización a través de IFNAR e IRF-1 (Honda et al., 2006). Esta conclusión fue establecida en base a la substancial reducción en IL-12 p35 observada tras estimulación con LPS de BMDC generadas a partir de ratones IFNAR KO (Gautier et al., 2005), así como tras la estimulación con CpG e IFN γ de BMDC de ratones deficientes en IRF-1 (Negishi et al., 2006), molécula que, como se ha comentado anteriormente, es clave para la síntesis de iNOS e IL-12 p35 tras la activación de la vía de IFNAR.

Estas discrepancias entre subtipos de células dendríticas y macrófagos, con respecto a la contribución de la vía autocrina dependiente de IFNAR sobre la producción de IFN de tipo I y de citoquinas proinflamatorias, demuestra que la definición de una ruta de señalización en un determinado tipo celular no permite su generalización a otras poblaciones celulares, siendo necesario analizar específicamente dicha vía en cada tipo celular.

Finalmente, nuestros resultados han permitido establecer que la expresión de iNOS y HO-1 en las moDC activadas con LPS es dependiente de la señalización autocrina inducida por IFNAR. En este sentido, se ha demostrado en macrófagos peritoneales activados a través de TLR-4 que la síntesis de NO es dependiente de IFNAR (Toshchakov et al., 2002); sin embargo, hasta el momento no se había descrito en DC que la vía de IFNAR controlase el metabolismo del NO/HO-1. Este resultado podría ser especialmente relevante en las respuestas frente a patógenos en las que la producción de NO por las moDC podría incrementarse debido al efecto sinérgico de ligandos de TLR y el IFN de tipo I producido por otros tipos celulares (por ejemplo las pDC), que podría resultar en una respuesta citoprotectora y microbicida más eficaz.

Figura D1

**Figura D1. Esquema de la señalización inducida por TLR4 e IFNAR en las moDC activadas con LPS.**

El LPS señala a través de TLR-4, que induce la activación de MyD88 y TRIF. La activación de la vía dependiente de MyD88 induce la transcripción de IL-1β, IL-6 e IL-12 p40 a través de NF-κB y AP-1. La vía de TRIF activa IRF-3, el cual junto con NF-κB y AP-1, induce la transcripción de IFNβ. El IFNβ señala de forma autocrina a través de IFNAR. La vía dependiente de IFNAR conduce a la activación de iNOS a través de IRF-1. La segunda oleada de IFN de tipo I inducida por IRF-7 e IRF-3 a través de IFNAR no existe en las moDC.

Regulación por lovastatina de la señalización por TLR-4 e IFNAR en las stat-moDC activadas por LPS

El análisis de las moléculas implicadas en la señalización iniciada por TLR-4 en las moDC nos proporcionó una posible explicación para los efectos de la lovastatina sobre la respuesta a LPS de las stat-moDC. Por un lado, la mayor activación de p38 MAPK observada en las stat-moDC estimuladas con LPS podría explicar el incremento en la síntesis de citoquinas proinflamatorias, así como la elevada producción de IFNβ. En este sentido, se ha descrito

que la proteína quinasa p38 participa tanto en la síntesis de IL-1 β , IL-6 e IL-12, a través de MyD88, como en la síntesis de IFN β , por la vía dependiente de TRIF (Akira et al., 2006). Como se ha comentado anteriormente, el análisis de la respuesta a LPS de las moDC de ratones deficientes para IFNAR reveló que la síntesis de la subunidad IL-12 p35 estaba controlada de forma similar por TLR-4 e IFNAR. Este resultado nos permitió explicar el aumento observado en la producción de IL-12 p70 por las stat-moDC estimuladas con LPS. La mayor producción de IL-12 p70 es un reflejo del balance entre el incremento en p40 y p35, debido a una regulación positiva de TLR-4 por la lovastatina, y la inhibición en p35, como consecuencia de la regulación negativa de la lovastatina sobre la vía de IFNAR. Con respecto a la señalización iniciada por IFNAR tras la estimulación con LPS de las stat-moDC, nuestros resultados demuestran que la lovastatina inhibe la expresión de iNOS. La síntesis de iNOS es el resultado de la activación de homodímeros de la molécula STAT-1, que a su vez inducen la expresión de IRF-1, factor de transcripción que se une al promotor de iNOS (Kamijo et al., 1994) y que, junto con NF- κ B (Xie et al., 1994), induce su transcripción. El análisis de los factores implicados en la señalización por IFNAR reveló que en las stat-moDC existía una deficiente expresión de IRF-1. Además observamos que la fosforilación de STAT-1 también estaba afectada en las stat-moDC, lo que se traducía en una menor activación de STAT-1 con respecto a las moDC control. Este resultado está de acuerdo con lo demostrado para macrófagos derivados de médula ósea de ratón, en los que la simvastatina inhibía la activación de STAT-1 inducida por IFN γ (Lee et al., 2008). También se ha descrito que la simvastatina bloquea la fosforilación de STAT-1 mediada por IFN β en las células de microglia (Nakamichi et al., 2006) y que en astrocitos primarios de rata, la lovastatina reduce la expresión de iNOS y la producción de NO en respuesta tanto a LPS solo como en combinación con otras citoquinas como TNF α o IFN γ (Pahan et al., 1997). Sin embargo, hasta el momento no se había descrito en células dendríticas que las estatinas tenían un efecto inhibitorio sobre la síntesis de iNOS inducida por la señalización a través de IFNAR.

El modelo propuesto para explicar los efectos de la lovastatina sobre la respuesta a LPS de las stat-moDC está representado en la [Figura D2](#). En dicho esquema se muestra la regulación positiva de la lovastatina sobre la vía de TLR-4, a nivel de la activación de las MAPK, lo que se traduce en un aumento en la síntesis de IL-12 p40, IL-12 p35, IL-1 β , IL-6 e IFN β . Por otro lado, la lovastatina regula negativamente la señalización autocrina a través de IFNAR, disminuyendo la síntesis de IRF-1, lo que tiene como consecuencia una reducción en la síntesis de IL-12 p35, iNOS y HO-1.

Figura D2

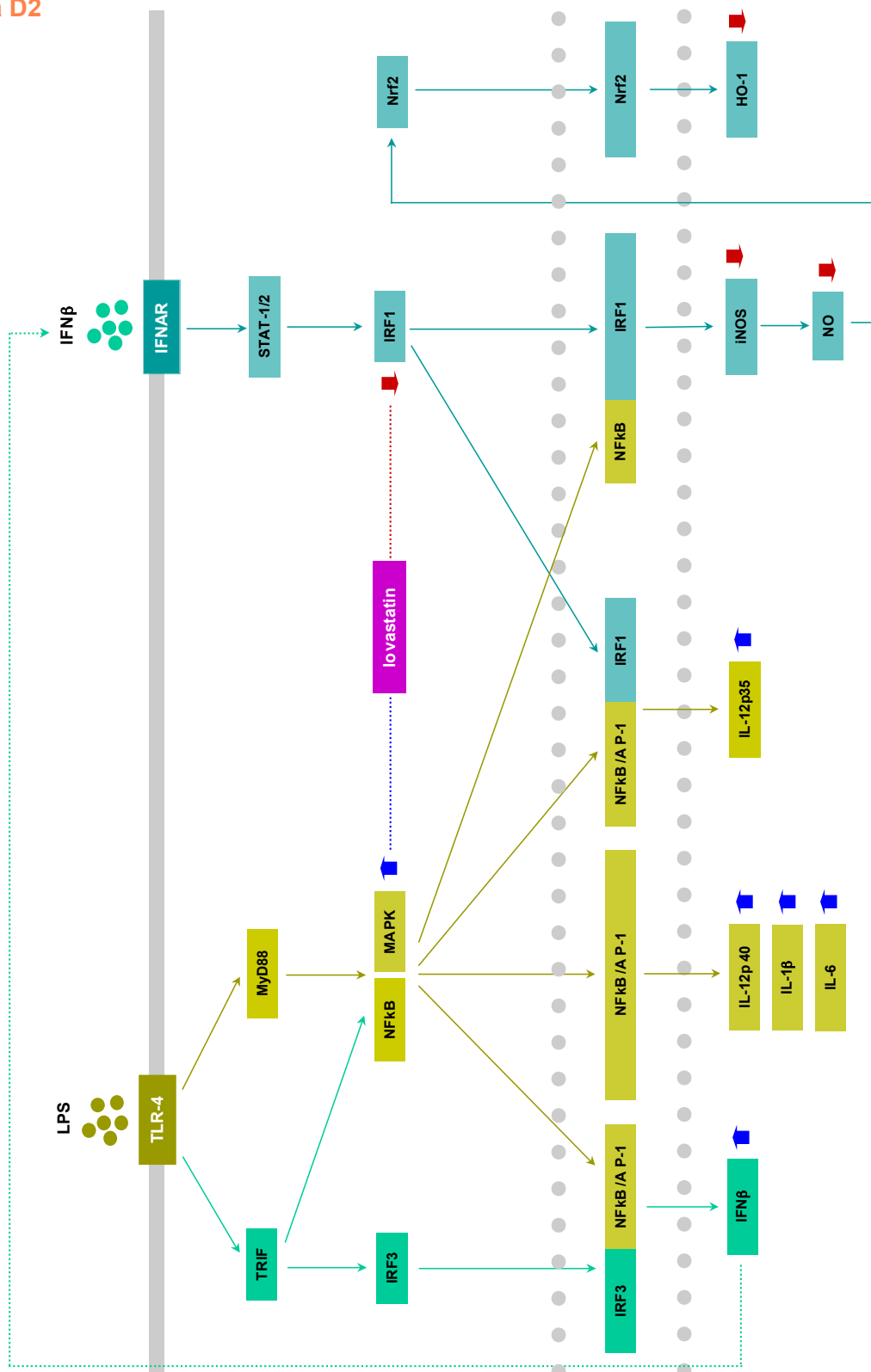


Figura D2. Modelo propuesto para la regulación por lovastatina de la respuesta a LPS de las stat-moDC. La lovastatina regula positivamente (flechas azules) la señalización a través de TLR4, a nivel de p38, promoviendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias (IL-12 p40, IL-1β e IL-6) y de IFNβ. Por otro lado, la lovastatina regula negativamente (flechas rojas) la vía dependiente de IFNAR, inhibiendo la síntesis de IRF-1, lo que se traduce en una menor expresión de iNOS y HO-1.

Efecto de la lovastatina sobre la producción de NO por las moDC durante la infección con *Listeria monocytogenes*

El defecto en el metabolismo del NO observado en las moDC diferenciadas *in vitro* en presencia de lovastatina fue validado *in vivo* en un modelo de infección con *Listeria monocytogenes*. Se ha demostrado que durante la respuesta frente a esta bacteria intracelular se genera en el bazo una población de DC derivadas de monocitos, denominadas TipDC (del inglés *TNF α and iNOS-producing DC*). Dichas células están especializadas en la producción de NO y TNF α , y tienen un papel fundamental en la eliminación del patógeno durante las primeras fases de la infección, ya que los ratones CCR2 KO son muy susceptibles a la infección con *Listeria* (Serbina et al., 2003). En los últimos años se ha descrito la presencia de TipDC durante la infección por otras bacterias como *Salmonella typhimurium* (Rydstrom and Wick, 2007) o *Brucella melitensis* (Copin et al., 2007), así como durante la respuesta inmune frente a parásitos como *Leishmania major* (De Trez et al., 2009) o *Trypanosoma brucei brucei* (Guilliams et al., 2009). El modelo de infección con *Listeria monocytogenes* era el adecuado para validar los datos obtenidos con las stat-moDC activadas a través de TLR4 por varios motivos. En primer lugar, las TipDC son DC derivadas de monocitos, al igual que las moDC de los cultivos *in vitro*. Además la respuesta inmune frente a *Listeria monocytogenes* requiere la señalización a través de un receptor TLR. En este sentido, se ha descrito que la inmunidad innata frente a *Listeria* es dependiente de MyD88 (Edelson and Unanue, 2002), lo que indica la participación de un receptor TLR o alternativamente del receptor de IL-1 β o IL-18. Sin embargo, la implicación del IL-1R o del IL-18R parece poco probable, ya que los ratones deficientes en la caspasa-1, enzima responsable de procesar las formas inmaduras de IL-1 e IL-18 para generar las formas activas, muestran una susceptibilidad prácticamente normal a la infección con *Listeria* (Tsuji et al., 2004).

Nuestros resultados demuestran que las moDC (TipDC) generadas en el bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes* y tratados con lovastatina presentan un defecto en la síntesis de iNOS con respecto a las moDC de ratones infectados con *Listeria*, pero no tratados. Dicha inhibición en la expresión de iNOS sugiere que existe un defecto en la producción de NO por las moDC del bazo, en base a la correlación observada *in vitro* entre la expresión de iNOS y la producción de NO por las moDC. Además de esta disminución en el porcentaje de moDC iNOS⁺ observamos una importante reducción en el número absoluto de moDC en ratones infectados con *Listeria* y pretratados con lovastatina, lo que tenía como consecuencia una significativa disminución en el número total de moDC productoras de NO (moDC iNOS⁺) en el bazo durante la respuesta frente a *Listeria*. Por lo tanto, teniendo en cuenta el importante papel de las TipDC en la eliminación temprana de la *Listeria* debido a la acción microbicida del NO, la reducción en la producción NO por el pretratamiento con

lovastatina debería traducirse en un defecto en el control de la replicación de la bacteria. Sin embargo, el análisis de la carga bacteriana en el bazo de los ratones infectados reveló que, contrariamente a lo esperado, el número de bacterias era inferior en presencia de lovastatina. Encontramos una posible explicación a este resultado en el fuerte incremento en el número de neutrófilos observado en los ratones tratados con lovastatina, incluso en ausencia de infección. Los neutrófilos proporcionan la primera línea de defensa del sistema inmune innato gracias a su capacidad de fagocitosis y eliminación de bacterias y hongos. Para ello, disponen de vacuolas fagocíticas en las que la muerte del patógeno está mediada por la NADPH oxidasa, que genera radicales libres y provoca un aumento de pH dentro de la vacuola. Este elevado pH permite que actúen las proteasas de los gránulos citoplásmicos, que se liberan a la vacuola cuando la oxidasa comienza su actividad y se encargan de eliminar el patógeno (Segal, 2005). Por otra parte, se ha demostrado el papel fundamental de los neutrófilos en la respuesta temprana frente a la infección con *Listeria*. En este sentido, los ratones infectados con *Listeria* y a los que se les deplecionaron los neutrófilos, mediante la administración de un anticuerpo contra la molécula Gr-1, presentaban un claro incremento en la mortalidad (Rogers and Unanue, 1993). Por lo tanto, el elevado número de neutrófilos reclutados al bazo por efecto del tratamiento con lovastatina, antes y durante la infección con *Listeria*, podría contribuir a una eliminación más rápida de la bacteria, que contrarrestaría el efecto negativo de la lovastatina sobre la producción de NO por las TipDC.

CONCLUSIONS

Regulación por la lovastatina de la activación de las moDC a través de un TLR

1.- La lovastatina tiene un efecto tóxico dosis-dependiente sobre la viabilidad de los monocitos diferenciados *in vitro* a moDC, lo que determina la utilización de una concentración de lovastatina en los cultivos inferior a 1 μ M.

2.- Las moDC diferenciadas en presencia de lovastatina (stat-moDC) y activadas con LPS expresan menores niveles de moléculas de coestimulación, lo que está correlacionado con una menor capacidad para estimular células T antígeno-específicas *in vitro*. Sin embargo, la activación *in vivo* de dichas células T por las stat-moDC es correcta.

3.- La lovastatina regula positivamente la vía de TLR-4, ya que las stat-moDC estimuladas con LPS producen mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias e IFN β . Además, este incremento en la síntesis de IL-1 β , IL-6, IL-12 p70, así como de IFN β , está correlacionado con una mayor fosforilación de p38 MAPK.

4.- La lovastatina regula negativamente la vía dependiente de IFNAR, lo que se traduce en una menor inducción de iNOS en las stat-moDC activadas con LPS. A su vez, la inhibición parcial iNOS conlleva una disminución en la producción de óxido nítrico (NO). Las stat-moDC presentan una menor inducción de IRF-1 y una menor fosforilación de STAT-1, lo que podría explicar la activación defectuosa del metabolismo del NO en presencia de lovastatina.

5.- Como consecuencia de la reducción en las stat-moDC de la síntesis de NO inducida por el LPS se inhibe la síntesis de HO-1. Esta disminución en la expresión de HO-1 afecta a la capacidad citoprotectora de la stat-moDC en respuesta a LPS, lo que se refleja en un aumento en los niveles de ROS dentro de la célula. Por lo tanto, la lovastatina inhibe la activación del metabolismo de iNOS/HO-1 dependiente de IFNAR en las moDC estimuladas con LPS.

6.- La lovastatina bloquea la producción de NO por las TipDC generadas en el bazo durante la infección con *Listeria monocytogenes*. Debido al origen monocítico de las TipDC, este resultado valida *in vivo* los resultados obtenidos *in vitro* con las stat-moDC activadas con LPS.

Contribución de la señalización autocrina por IFNAR a la activación de las moDC en respuesta a LPS

7.- La síntesis de IFN β en las moDC estimuladas con LPS depende únicamente de la señalización a través de TLR-4, es decir, en las moDC no existe una segunda oleada de producción de IFN de tipo I inducida por la señalización autocrina a través de IFNAR.

8.- La producción de IL-12 p70 en las moDC estimuladas con LPS está dualmente controlada por TLR-4 e IFNAR. Por un lado, la síntesis de p40 depende casi exclusivamente de la vía de TLR-4. Por otro lado, la síntesis de p35 está controlada de forma similar por la vía de TLR-4 y por la vía de IFNAR.

9.- La activación de iNOS/HO-1 inducida por el LPS en las moDC depende mayoritariamente de la vía inducida por IFNAR, aunque requiere de la señalización a través de TLR4.

BIBLIOGRAFÍA

Abeles, A.M., and Pillinger, M.H. (2006). Statins as antiinflammatory and immunomodulatory agents: a future in rheumatologic therapy? *Arthritis Rheum* 54, 393-407.

Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., and Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20, 319-325.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.

Akashi-Takamura, S., and Miyake, K. (2008). TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 20, 420-425.

Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., *et al.* (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3957-3961.

Aldridge, J.R., Jr., Moseley, C.E., Boltz, D.A., Negovetich, N.J., Reynolds, C., Franks, J., Brown, S.A., Doherty, P.C., Webster, R.G., and Thomas, P.G. (2009). TNF/ iNOS -producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5306-5311.

Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R.A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117, 515-526.

Ardavin, C., Amigorena, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity* 20, 17-23.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204, 1057-1069.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666-670.

Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., *et al.* (2009). CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206, 595-606.

Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W., and Vercellotti,

- G.M. (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267, 18148-18153.
- Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., and Snyder, S.H. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16093-16098.
- Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R.M., and Barton, G.M. (2009). Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol* 10, 1200-1207.
- Bedoui, S., Prato, S., Mintern, J., Gebhardt, T., Zhan, Y., Lew, A.M., Heath, W.R., Villadangos, J.A., and Segura, E. (2009). Characterization of an immediate splenic precursor of CD8+ dendritic cells capable of inducing antiviral T cell responses. *J Immunol* 182, 4200-4207.
- Bettelli, E., Korn, T., and Kuchroo, V.K. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19, 652-657.
- Bibb, W.F., Gellin, B.G., Weaver, R., Schwartz, B., Plikaytis, B.D., Reeves, M.W., Pinner, R.W., and Broome, C.V. (1990). Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Appl Environ Microbiol* 56, 2133-2141.
- Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P., and Portnoy, D.A. (1990). *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345, 175-176.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907-916.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., *et al.* (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-525.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., *et al.* (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4, 702-707.
- Chen, W., Frank, M.E., Jin, W., and Wahl, S.M. (2001). TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14, 715-725.
- Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J.J., and Muraille, E. (2007). MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *J Immunol* 178, 5182-5191.
- Coquerelle, C., and Moser, M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev* 234, 317-334.
- Czuprynski, C.J., Brown, J.F., Maroushek, N., Wagner, R.D., and Steinberg, H. (1994). Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 152, 1836-1846.

D'Amico, A., and Wu, L. (2003). The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* 198, 293-303.

De Trez, C., Magez, S., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y., and Muraille, E. (2009). iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania* major infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog* 6, 1-13.

del Hoyo, G.M., Martin, P., Vargas, H.H., Ruiz, S., Arias, C.F., and Ardavin, C. (2002). Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* 415, 1043-1047.

Dinarello, C.A. (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell* 140, 935-950.

Dominguez, P.M., and Ardavin, C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev* 234, 90-104.

Dustin, M.L. (2006). Impact of the immunological synapse on T cell signaling. *Results Probl Cell Differ* 43, 175-198.

Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., *et al.* (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207, 823-836.

Edelson, B.T., and Unanue, E.R. (2002). MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to *Listeria*: no role for either in macrophage listericidal activity. *J Immunol* 169, 3869-3875.

Eidsmo, L., Allan, R., Caminschi, I., van Rooijen, N., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Differential migration of epidermal and dermal dendritic cells during skin infection. *J Immunol* 182, 3165-3172.

Endo, A., Kuroda, M., and Tsujita, Y. (1976). ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)* 29, 1346-1348.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.

Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170, 2081-2095.

Fleming, T.J., Fleming, M.L., and Malek, T.R. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 151, 2399-2408.

Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83-87.

Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes*

into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65, 1127-1141.

Gautier, G., Humbert, M., Deauvieu, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E.E., Trinchieri, G., Caux, C., and Garrone, P. (2005). A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 201, 1435-1446.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.

Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., *et al.* (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103⁺ DCs. *J Exp Med* 206, 3115-3130.

Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubeau, M., Dai, X.M., Stanley, E.R., Randolph, G.J., and Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7, 265-273.

Girardin, S.E., Travassos, L.H., Herve, M., Blanot, D., Boneca, I.G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., and Mengin-Lecreulx, D. (2003). Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* 278, 41702-41708.

Goodridge, H.S., and Underhill, D.M. (2008). Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1. *Handb Exp Pharmacol*, 87-109.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.

Greenwood, J., Steinman, L., and Zamvil, S.S. (2006). Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol* 6, 358-370.

Guilliams, M., Movahedi, K., Bosschaerts, T., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., Herin, M., Acosta-Sanchez, A., Ma, L., Moser, M., Van Ginderachter, J.A., *et al.* (2009). IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection. *J Immunol* 182, 1107-1118.

Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G., *et al.* (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439, 204-207.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., *et al.* (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100.

Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U., and Beutler, B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433, 523-527.

Honda, K., Sakaguchi, S., Nakajima, C., Watanabe, A., Yanai, H., Matsumoto, M., Ohteki, T., Kaisho, T., Takaoka, A., Akira, S., *et al.* (2003). Selective contribution of IFN- α /beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10872-10877.

Honda, K., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2006). Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* *25*, 349-360.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* *434*, 772-777.

Iijima, N., Linehan, M.M., Saeland, S., and Iwasaki, A. (2007). Vaginal epithelial dendritic cells renew from bone marrow precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 19061-19066.

Istvan, E.S., and Deisenhofer, J. (2001). Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* *292*, 1160-1164.

Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H., and Lee, J.O. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* *130*, 1071-1082.

Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* *125*, 943-955.

Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* *9*, 361-368.

Kamath, A.T., Henri, S., Battye, F., Tough, D.F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* *100*, 1734-1741.

Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S.I., Kimura, T., Green, S.J., and *et al.* (1994). Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* *263*, 1612-1615.

Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.G., and Lee, J.O. (2009). Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* *31*, 873-884.

Kang, S.J., Liang, H.E., Reizis, B., and Locksley, R.M. (2008). Regulation of hierarchical clustering and activation of innate immune cells by dendritic cells. *Immunity* *29*, 819-833.

Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* *3*, 984-993.

Karin, M., and Greten, F.R. (2005). NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* *5*, 749-759.

Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I.L., and Manz, M.G. (2003). Flt3 ligand

regulates dendritic cell development from Flt3⁺ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3⁺ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 198, 305-313.

Kawai, T., and Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ* 13, 816-825.

Kawai, T., and Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin Immunol* 19, 24-32.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.

Kiener, P.A., Davis, P.M., Murray, J.L., Youssef, S., Rankin, B.M., and Kowala, M. (2001). Stimulation of inflammatory responses in vitro and in vivo by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. *Int Immunopharmacol* 1, 105-118.

King, I.L., Dickendesher, T.L., and Segal, B.M. (2009). Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113, 3190-3197.

Koch, G., Benz, C., Schmidt, G., Olenik, C., and Aktories, K. (1997). Role of Rho protein in lovastatin-induced breakdown of actin cytoskeleton. *J Pharmacol Exp Ther* 283, 901-909.

Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.

Kou, R., Sartoretto, J., and Michel, T. (2009). Regulation of Rac1 by simvastatin in endothelial cells: differential roles of AMP-activated protein kinase and calmodulin-dependent kinase kinase-beta. *J Biol Chem* 284, 14734-14743.

Kwak, B., Mulhaupt, F., Myit, S., and Mach, F. (2000). Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 6, 1399-1402.

Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J., and Liao, J.K. (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97, 1129-1135.

Le Borgne, M., Etchart, N., Goubier, A., Lira, S.A., Sirard, J.C., van Rooijen, N., Caux, C., Ait-Yahia, S., Vicari, A., Kaiserlian, D., and Dubois, B. (2006). Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8⁺ T cell crosspriming in vivo. *Immunity* 24, 191-201.

Lee, S.J., Qin, H., and Benveniste, E.N. (2008). The IFN-gamma-induced transcriptional program of the CIITA gene is inhibited by statins. *Eur J Immunol* 38, 2325-2336.

LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G.D., Ruland, J., and Reis e Sousa, C. (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8, 630-638.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response

in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.

Leon, B., and Ardavin, C. (2008a). Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. *Blood* **111**, 3126-3130.

Leon, B., and Ardavin, C. (2008b). Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* **86**, 320-324.

Leon, B., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* **26**, 519-531.

Leung, B.P., Sattar, N., Crilly, A., Prach, M., McCarey, D.W., Payne, H., Madhok, R., Campbell, C., Gracie, J.A., Liew, F.Y., and McInnes, I.B. (2003). A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *J Immunol* **170**, 1524-1530.

Liao, J.K. (2002). Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest* **110**, 285-288.

Liu, K., Vitoria, G.D., Schwickert, T.A., Guernonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis. *Science*.

Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2008). In vivo induction of immune responses to pathogens by conventional dendritic cells. *Immunity* **29**, 343-351.

Lyman, S.D., and Jacobsen, S.E. (1998). c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* **91**, 1101-1134.

MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**, 323-350.

Mahnke, K., and Enk, A.H. (2005). Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr Top Microbiol Immunol* **293**, 133-150.

Manz, M.G., Traver, D., Akashi, K., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., and Weissman, I.L. (2001). Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann N Y Acad Sci* **938**, 167-173; discussion 173-164.

Marie, I., Durbin, J.E., and Levy, D.E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* **17**, 6660-6669.

Maron, D.J., Fazio, S., and Linton, M.F. (2000). Current perspectives on statins. *Circulation* **101**, 207-213.

Martin, P., Ruiz, S.R., del Hoyo, G.M., Anjuere, F., Vargas, H.H., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2002). Dramatic increase in lymph node dendritic cell number during infection by the mouse mammary tumor virus occurs by a CD62L-dependent blood-borne DC recruitment. *Blood* **99**, 1282-1288.

- Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27, 229-265.
- Matsumoto, M., Einhaus, D., Gold, E.S., and Aderem, A. (2004). Simvastatin augments lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses in macrophages by differential regulation of the c-Fos and c-Jun transcription factors. *J Immunol* 172, 7377-7384.
- Mayerova, D., Parke, E.A., Bursch, L.S., Odumade, O.A., and Hogquist, K.A. (2004). Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state. *Immunity* 21, 391-400.
- McCarey, D.W., Capell, H.A., and Madhok, R. (2002). Leflunomide in treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 359, 1158.
- McTaggart, F., Buckett, L., Davidson, R., Holdgate, G., McCormick, A., Schneck, D., Smith, G., and Warwick, M. (2001). Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am J Cardiol* 87, 28B-32B.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4, 762-774.
- Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U.K., Mack, M., Heikenwalder, M., Bruck, W., Priller, J., and Prinz, M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10, 1544-1553.
- Minamino, T., Christou, H., Hsieh, C.M., Liu, Y., Dhawan, V., Abraham, N.G., Perrella, M.A., Mitsialis, S.A., and Kourembanas, S. (2001). Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8798-8803.
- Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7, 610-621.
- Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037-3047.
- Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7, 663-671.
- Nakamichi, K., Saiki, M., Kitani, H., Kuboyama, Y., Morimoto, K., Takayama-Ito, M., and Kurane, I. (2006). Suppressive effect of simvastatin on interferon-beta-induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neurosci Lett* 407, 205-210.
- Nakano, H., Lin, K.L., Yanagita, M., Charbonneau, C., Cook, D.N., Kakiuchi, T., and Gunn, M.D. (2009). Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat Immunol* 10, 394-402.

Nath, N., Giri, S., Prasad, R., Singh, A.K., and Singh, I. (2004). Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy. *J Immunol* 172, 1273-1286.

Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., Takayanagi, H., Ohba, Y., Taniguchi, T., and Honda, K. (2006). Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15136-15141.

Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000034.

Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8, 1207-1216.

Otterbein, L.E., Bach, F.H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R.J., Flavell, R.A., and Choi, A.M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6, 422-428.

Otterbein, L.E., Kolls, J.K., Mantell, L.L., Cook, J.L., Alam, J., and Choi, A.M. (1999). Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J Clin Invest* 103, 1047-1054.

Otterbein, L.E., Soares, M.P., Yamashita, K., and Bach, F.H. (2003). Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24, 449-455.

Pahan, K., Sheikh, F.G., Namboodiri, A.M., and Singh, I. (1997). Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* 100, 2671-2679.

Pamer, E.G. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* 4, 812-823.

Paul, F., Waiczies, S., Wuerfel, J., Bellmann-Strobl, J., Dorr, J., Waiczies, H., Haertle, M., Wernecke, K.D., Volk, H.D., Aktas, O., and Zipp, F. (2008). Oral high-dose atorvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One* 3, e1928.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.

Poss, K.D., and Tonegawa, S. (1997). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10919-10924.

Pulendran, B., Tang, H., and Manicassamy, S. (2010). Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol* 11, 647-655.

Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753-761.

- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6, 476-483.
- Richez, C., Yasuda, K., Watkins, A.A., Akira, S., Lafyatis, R., van Seventer, J.M., and Rifkin, I.R. (2009). TLR4 ligands induce IFN-alpha production by mouse conventional dendritic cells and human monocytes after IFN-beta priming. *J Immunol* 182, 820-828.
- Rogers, H.W., and Unanue, E.R. (1993). Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect Immun* 61, 5090-5096.
- Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L., Brown, G.D., and Reis, E.S.C. (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22, 507-517.
- Rydstrom, A., and Wick, M.J. (2007). Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral *Salmonella* infection. *J Immunol* 178, 5789-5801.
- Sakaguchi, S., Negishi, H., Asagiri, M., Nakajima, C., Mizutani, T., Takaoka, A., Honda, K., and Taniguchi, T. (2003). Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 860-866.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., and Akira, S. (2003). Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171, 4304-4310.
- Segal, A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23, 197-223.
- Sena, A., Pedrosa, R., and Graca Morais, M. (2003). Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. *J Neurol* 250, 754-755.
- Serbina, N.V., Kuziel, W., Flavell, R., Akira, S., Rollins, B., and Pamer, E.G. (2003a). Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity* 19, 891-901.
- Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7, 311-317.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003b). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59-70.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4, E131-136.

Sherer, Y., and Shoenfeld, Y. (2002). Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 1, 21-27.

Sindermann, J.R., Fan, L., Weigel, K.A., Troyer, D., Muller, J.G., Schmidt, A., March, K.L., and Breithardt, G. (2000). Differences in the effects of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and viability of smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 150, 331-341.

Snijders, A., Hilkens, C.M., van der Pouw Kraan, T.C., Engel, M., Aarden, L.A., and Kapsenberg, M.L. (1996). Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *J Immunol* 156, 1207-1212.

Sokol, C.L., Chu, N.Q., Yu, S., Nish, S.A., Laufer, T.M., and Medzhitov, R. (2009). Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol* 10, 713-720.

Sporri, R., and Reis e Sousa, C. (2005). Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 6, 163-170.

Srisook, K., Kim, C., and Cha, Y.N. (2005). Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: de-repression by heme and activation by Nrf2, the "one-two" punch. *Antioxid Redox Signal* 7, 1674-1687.

Stanislaus, R., Pahan, K., Singh, A.K., and Singh, I. (1999). Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin. *Neurosci Lett* 269, 71-74.

Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296.

Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 351-358.

Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191, 411-416.

Stetson, D.B., and Medzhitov, R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93-103.

Stone, T.W., and Darlington, L.G. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1, 609-620.

Sun, D., and Fernandes, G. (2003). Lovastatin inhibits bone marrow-derived dendritic cell maturation and upregulates proinflammatory cytokine production. *Cell Immunol* 223, 52-62.

Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172, 4410-4417.

Swirski, F.K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F.W., Weissleder, R., and Pittet, M.J.

(2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 117, 195-205.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., *et al.* (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616.

Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.

Tang, H., Cao, W., Kasturi, S.P., Ravindran, R., Nakaya, H.I., Kundu, K., Murthy, N., Kepler, T.B., Malissen, B., and Pulendran, B. (2010). The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell-basophil cooperation via ROS-mediated signaling. *Nat Immunol* 11, 608-617.

Taniguchi, T., and Takaoka, A. (2002). The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 14, 111-116.

Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S., and Miyake, K. (2008). Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 94-99.

Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., and Ohteki, T. (2007). Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* 448, 929-933.

Thomas, P.B., Albin, T., Giri, R.K., See, R.F., Evans, M., and Rao, N.A. (2005). The effects of atorvastatin in experimental autoimmune uveitis. *Br J Ophthalmol* 89, 275-279.

Toshchakov, V., Jones, B.W., Perera, P.Y., Thomas, K., Cody, M.J., Zhang, S., Williams, B.R., Major, J., Hamilton, T.A., Fenton, M.J., and Vogel, S.N. (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 3, 392-398.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.

Tsuji, N.M., Tsutsui, H., Seki, E., Kuida, K., Okamura, H., Nakanishi, K., and Flavell, R.A. (2004). Roles of caspase-1 in *Listeria* infection in mice. *Int Immunol* 16, 335-343.

Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.G., Jung, Y.J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., *et al.* (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 9, 769-776.

Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., and Jung, S. (2006). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med*.

Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aycheh, T., Shapira, Y., Lucche, H., Fehling, H.J., Hardt,

W.D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-512.

Vaughan, C.J., Murphy, M.B., and Buckley, B.M. (1996). Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 348, 1079-1082.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.

Villadangos, J.A., and Heath, W.R. (2005). Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: Limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin Immunol* 17, 262-272.

Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7, 543-555.

Wakim, L.M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2008). Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* 319, 198-202.

Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Guernonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., and Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* 9, 676-683.

Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., and Villadangos, J.A. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 102, 2187-2194.

Wilson, N.S., and Villadangos, J.A. (2004). Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol Cell Biol* 82, 91-98.

Wilson, N.S., and Villadangos, J.A. (2005). Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv Immunol* 86, 241-305.

Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., and Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269, 4705-4708.

Yamazaki, S., Dudziak, D., Heidkamp, G.F., Fiorese, C., Bonito, A.J., Inaba, K., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2008). CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 181, 6923-6933.

Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., and Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-1629.

Yilmaz, A., Reiss, C., Weng, A., Cicha, I., Stumpf, C., Steinkasserer, A., Daniel, W.G., and Garlachs, C.D. (2006). Differential effects of statins on relevant functions of human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 79, 529-538.

Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Murai, M., Itakura, M., Ishikawa, S., Hasegawa, G., Naito, M., Asakura, H., and Matsushima, K. (2001). Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med* 193, 35-49.

Yoneyama, M., and Fujita, T. (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* 227, 54-65.

Youssef, S., Stuve, O., Patarroyo, J.C., Ruiz, P.J., Radosevich, J.L., Hur, E.M., Bravo, M., Mitchell, D.J., Sobel, R.A., Steinman, L., and Zamvil, S.S. (2002). The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420, 78-84.

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-1526.

Zhang, F.L., and Casey, P.J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65, 241-269.

ANEXO

Inhibition of iNOS/HO-1 metabolism by statins reveals an IFN- β -dependent microbicidal/cytoprotective pathway on activated mouse monocyte-derived dendritic cells

Pilar M. Domínguez¹, María López-Bravo¹, Ulrich Kalinke² and Carlos Ardavín¹

¹ Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, 28049 Madrid, Spain.

² TWINCORE[§], Centre for Experimental and Clinical Infection Research, Feodor-Lynen-Str. 7, 30625 Hannover, Germany.

Corresponding author: Carlos Ardavín, Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, 28049 Madrid, Spain. Email: ardavin@cnb.csic.es. Phone: +34-915854841. Fax: +34-913720493.

Short Title: Statin-mediated inhibition of iNOS on DCs

[§] a joint venture between the Medical School Hannover and the Helmholtz-Centre for Infection Research.

Abstract

Statins are prescribed to 25-million people worldwide for treating hypercholesterolemia and reducing the risk of cardiovascular diseases. However the side effects of statins on the immune system have not been analyzed in-depth. Here we have investigated the impact of lovastatin on the responsiveness of monocyte-derived DCs (moDCs) to TLR-mediated activation. Lovastatin caused a positive regulation of TLR-4 signaling that was paralleled by a higher activation of p38 MAP-kinase, leading to an increased proinflammatory cytokine and IFN- β production. In contrast, lovastatin promoted a negative regulation of IFN- β -mediated autocrine signaling, paralleled by a lower expression of the transcription factor IRF-1, leading to the inhibition of the enzymes iNOS and HO-1. Interestingly iNOS/HO-1 activation and NO production by LPS-

stimulated moDCs was strictly controlled by autocrine signalling through the type-I IFN receptor IFNAR. Defective iNOS/HO-1 activation on moDCs resulted in limited cytoprotective capacity against ROS and reduced microbicidal potential. These *in vitro* data were validated using an *in vivo* model of *Listeria* infection that revealed that iNOS activation by splenic inflammatory mo-DCs was strongly reduced in lovastatin treated mice. Statin treatment could therefore have severe implications during immune responses in which defective activation of iNOS/HO-1 metabolism might lead to a failure of immunity.

Introduction

Statins are drugs with multiple lipid-lowering effects such as the inhibition of endogenous cholesterol synthesis, the increase in uptake and degradation of LDL and the blockade of lipoprotein secretion. Statins are prescribed to more than 25 million people worldwide for the treatment of hypercholesterolemia and to reduce the risk of atherosclerosis and heart attack.¹ Since people with or at risk of cardiovascular disease are subjected to statin treatment for long periods, or even during lifetime, the potential side effects of such treatments have to be taken into consideration. Several reports have addressed the influence of statins on the immune system, but the conclusions derived from these studies are controversial. Although recent data have revealed that statins can promote proinflammatory effects, they are generally considered anti-inflammatory drugs.² Besides, since DCs are responsible for the induction of T cell responses against pathogens and tumors, and for the presentation of self-antigens during autoimmune diseases, an in depth-analysis of the effect of statins on DC function has to be performed. Based on reports addressing the outcome of statin treatment on *in vitro* DC activation, it has been proposed that statin-treated DCs produce higher amounts of proinflammatory cytokines and are defective in stimulating antigen-specific T cells *in vitro*, in mice³ and humans.^{4,5} However, these studies have

neither analyzed the mechanisms responsible for these effects, nor determined the effect of statins during *in vivo* DC-mediated immune responses. Recent data have demonstrated that during infectious processes and inflammatory diseases, de novo-formed DCs rapidly replace those DCs pre-existing before the onset of these reactions.⁶ These inflammatory DCs derive to a large extent from newly-recruited monocytes and fulfil an important role in the induction of immune responses against pathogens and in the development of inflammatory diseases.

Here we have investigated the effect of lovastatin treatment during *in vitro* and *in vivo* monocyte differentiation into DCs, on the responsiveness to TLR-4 signaling induced by LPS of the resulting monocyte-derived DCs (moDCs), hereafter named stat-moDCs. Lovastatin caused opposite effects on the response to LPS of stat-moDCs by positively regulating the TLR-4 pathway, but negatively regulating the signaling pathway triggered by IFN- β -mediated autocrine stimulation of the IFN $\alpha\beta$ receptor (IFNAR). Positive regulation of TLR-4 signaling was paralleled by a stronger activation of the p38 MAP-kinase and led to an increased production of proinflammatory cytokines. In contrast, negative regulation of autocrine IFNAR signaling was paralleled by a lower expression of the transcription factor IRF-1, and led to a significant decrease in the levels of the enzymes iNOS and heme oxygenase-1 (HO-1). This defective activation of iNOS/HO-1 metabolism resulted in a limited cytoprotective capacity against reactive oxygen species (ROS) on stat-moDCs, and in a reduced nitric oxide (NO)-dependent microbicidal potential of moDCs differentiating *in vivo* during infection by *Listeria*.

Methods

C57BL/6 mice were purchased from Harlan (Bicester, UK). IFNAR^{-/-} mice in a C57BL/6 genetic background were generated by Dr. Ulrich Kalinke (Center for Experimental and Clinical Infection Research, Hannover, Germany). C57BL/6 Ly5.1 Pep^{3b} and OVA₃₂₃-

339-specific TCR-transgenic OT-II mice were purchased from Jackson (Bar Harbor, Maine).

Differentiation of moDCs was achieved by culturing monocytes in 24-well plates with 20 ng/ml GM-CSF (Peprotech, London, UK) for 48 h at 37°C and 5% CO₂, in the presence or absence of 1 µM lovastatin (Sigma, St Louis, MO). Monocyte isolation and moDC purification are described in Supplemental data. Antibodies used in this study for immunomagnetic depletion, MACS positive selection and flow cytometry are listed in Supplemental data.

The phenotypic analysis of moDC cultures and splenic cell subpopulations in *Listeria* infection experiments, as well as *in vivo* OT-II cell stimulation, detection of intracellular iNOS and production of ROS were performed by flow cytometry. Flow cytometry methods are described in Supplemental data.

Confocal microscopy studies were performed on moDCs cultured on 12 mm coverslips in 24-well plates, fixed with 2% formaldehyde, permeabilized with Triton X-100 and stained with rabbit anti-p65 or rabbit anti-Nrf2 followed by biotin-conjugated goat anti-rabbit antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and Alexa Fluor 488-conjugated neutravidin (Molecular Probes, Eugene, OR). Micrographs were obtained using an Olympus IX81 microscope.

Production of cytokines and NO was analyzed 16 h after stimulation of moDCs with 4 µg/ml LPS from *E. Coli* (Sigma). Cytokines were analyzed using BD-OptEIA ELISA kits (BD Biosciences, San Diego, CA). NO was analyzed by the Griess reaction using a Nitrate/nitrite Colorimetric Assay Kit (Fluka, Buchs, Switzerland).

For western blot analysis, cell lysates from purified moDCs were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes that were incubated with antibodies specific for p38, phosphorylated p38, iNOS, STAT1, phosphorylated STAT1, HO-1, or β-actin. A detailed description of the western blot method is included in Supplemental data.

qRT-PCR was performed using a FluoCycle SYBR Green mix (EuroClone, Milano, Italy) on an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Primer sequences are listed in Supplemental data. Analysis was performed using the SDS v2.2 software (Applied Biosystems).

For *in vivo* T cell stimulation assays, CFSE-labelled OT-II cells were injected intravenously in C57BL/6 Ly5.1 Pep^{3b} mice. After 24 h, LPS-stimulated moDCs or stat-moDCs, pulsed with 1 mg/ml OVA protein (Sigma), were injected subcutaneously in the hind footpad. OT-II cell activation and proliferation were analyzed in the draining PO-LNs after 72 h by flow cytometry.

For *Listeria* infection experiments, mice were treated intraperitoneally daily, during one week, with 200 µg lovastatin or PBS, and then injected intravenously with 3000 *Listeria monocytogenes* 10403S strain (kindly provided by Dr. Thomas Decker, University of Vienna, Austria). At indicated times, spleens were analyzed as described in Supplemental data.

Results

Response to LPS of DCs differentiated from monocytes in the presence of lovastatin

To analyze the effect of statin treatment on the differentiation of monocytes into DCs, monocytes were cultured for 48 h in the presence of 20 ng/ml GM-CSF and 1 µM lovastatin. The concentration of lovastatin used in this study was determined on the basis of titration experiments described in Supplemental Figure 1. Cultures of monocytes with GM-CSF for 48 h contained around 80% DCs, defined as CD11c⁺ MHC class-II (MHC-II)⁺ cells (Figure 1A). Lovastatin treatment neither affected moDC differentiation nor resulted in a detectable increase in the expression of costimulatory and activation molecules, such as CD86, CD40 and CD69, but led to the differentiation

of moDCs expressing higher MHC-II levels than control moDCs, thereafter named C-moDCs (Figures 1A-B).

After LPS-mediated activation, stat-moDCs underwent a lower upregulation of MHC-II, CD86, CD40 and CD69 than C-moDCs, resulting in a lower expression of CD86, CD40 and CD69 (Figures 1A-B). To determine whether this reduced costimulatory molecule expression by stat-moDCs was paralleled by a lower potential to induce T cell responses *in vivo*, the activation of intravenously transferred OT-II TCR transgenic CD4⁺ T cells by LPS-stimulated, OVA-loaded stat-moDCs injected subcutaneously, was analyzed in the draining popliteal lymph nodes (PO-LNs). No differences were found between stat-moDCs and C-moDCs in their ability to induce OT-II cell activation and proliferation *in vivo* (Figure 1C). This suggests that the defective upregulation of costimulatory molecules observed *in vitro* was probably overcome *in vivo* as a consequence of a correct stat-moDC activation resulting from the inflammatory reaction caused by the subcutaneous injection.

Based on previous data supporting that statins can promote anti-inflammatory effects,⁷ we next analyzed whether lovastatin treatment affected the capacity of stat-moDCs to produce proinflammatory cytokines after LPS stimulation. Stat-moDCs produced around two-fold higher amounts of IL-1 β , IL-6, and IL-12 p70 than C-moDCs (Figure 1D).

TLR-4 signaling in LPS-activated stat-moDCs

To investigate the basis of this increased proinflammatory cytokine production by stat-moDCs, we analyzed the two main signaling pathways activated after TLR4 engagement, that are dependent on the adaptor molecules MyD88 and TRIF and lead to the activation of the transcription factors NF κ B and IRF3, respectively (Figure 6). We first explored the MyD88 pathway by evaluating two crucial events involved in MyD88-dependent cytokine production: the activation of the MAP-kinase p38 that activates the transcription factor AP-1, and the translocation to the nucleus of the transcription factor

NF κ B, that together with AP-1, control LPS-mediated proinflammatory cytokine production.⁸ Western blot analysis of p38 phosphorylation revealed that stat-moDCs underwent a higher p38 activation than C-moDCs, that declined progressively along the next 4 h after LPS stimulation, whereas C-moDCs displayed a lower and sustained p38 activation (Figure 2A). No differences in NF κ B translocation to the nucleus were observed between stat-moDCs and C-moDCs, as revealed by immunofluorescence staining of the p65 subunit of NF κ B and analysis by confocal microscopy (Figure 2B).

We next addressed whether lovastatin had an effect on the TRIF-dependent signaling pathway by analyzing the production of interferon (IFN)- β . IFN- β production is controlled by TRIF-dependent activation of the transcription factor IRF3, that together with NF κ B and AP-1, regulates the transcription of IFN- β .⁹ Analysis of IFN- β production by ELISA 16 h after LPS stimulation revealed that stat-moDCs produced around 2-fold higher IFN- β amounts than C-moDCs (Figure 2C). This result was confirmed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis of IFN- β mRNA expression (Figure 2D).

BMDCs differentiated with GM-CSF and TNF- α were reported to produce type-I IFN after LPS stimulation, by a process resulting not only from TRIF-dependent IRF3 activation, but additionally from autocrine stimulation through the IFNAR receptor by mean of the first wave of IFN- β production.¹⁰ To determine the contribution of autocrine IFNAR engagement to IFN- β production after LPS activation of moDCs, we analyzed the production of IFN- β by moDCs from IFNAR-deficient (IFNAR^{-/-}) mice. Production of IFN- β by LPS-stimulated IFNAR^{-/-} moDCs was not affected (Figure 2E), and consequently was independent of IFNAR signaling. Accordingly, LPS-mediated induction of IFN- β mRNA expression was not altered in IFNAR^{-/-} moDCs (not shown). Thus, in contrast to BMDCs, LPS-activated moDCs did not have the capacity to produce a second wave of IFN- β through autocrine IFNAR engagement. In addition,

our data revealed that the increased production of IFN- β by LPS-activated stat-moDCs was due to the effect of lovastatin on TLR4 signaling and not on IFNAR signaling.

IFNAR signaling and induction of nitric oxide metabolism in LPS-stimulated stat-moDCs

DC-mediated protective immune responses against intracellular pathogens rely on the production by DCs not only of proinflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, IL-12 and TNF α , but also of NO, due to its role in the induction of cytoprotective mechanisms against oxidative stress, and its microbicidal function.¹¹ Recent papers have stressed the crucial role played by a subset of moDCs specialized in TNF and NO production, called TipDCs, during bacterial and parasitic infections.¹²⁻¹⁴ The fact that stat-moDCs produced higher amounts of proinflammatory cytokines prompted us to investigate whether lovastatin also affected the production of NO by stat-moDCs in response to LPS. LPS-stimulated stat-moDCs produced around two-fold less NO than C-moDCs (Figure 3A). Since iNOS catalyzes the synthesis of NO from L-arginine and oxygen, we checked whether the reduced production of NO by stat-moDCs resulted from a lower iNOS expression. Western blot analysis confirmed that iNOS was expressed at lower levels in LPS-stimulated stat-moDCs than in C-moDCs (Figure 3B).

In LPS-stimulated macrophages, NO production, and therefore iNOS expression, have been proposed to be controlled by the STAT-1/IRF-1 pathway,¹⁵ by a process requiring the activation of NF κ B through TLR-4 signaling.¹⁶ To determine the contribution of IFNAR signaling to the production of NO in LPS-stimulated moDCs, NO production was analyzed in IFNAR^{-/-} moDCs. NO synthesis by LPS-activated moDCs was strongly dependent on IFNAR signaling, since no induction of NO production (determined from NO basal levels in unstimulated moDCs), was detectable in LPS-stimulated IFNAR^{-/-} moDCs (Figure 3A). Accordingly, LPS-mediated iNOS induction was significantly reduced in IFNAR^{-/-} moDCs compared to C-moDCs (Figure 3B) indicating that iNOS production was largely dependent on IFNAR signaling.

No reduction in LPS-induced iNOS expression was observed in IFNAR^{-/-} stat-moDCs compared to IFNAR^{-/-} C-moDCs (Figure 3B), suggesting that lovastatin negatively regulates the responsiveness of moDCs to IFNAR signaling, resulting in a reduced production of iNOS and NO by LPS-stimulated stat-moDCs. To confirm this hypothesis, we analyzed the effect of lovastatin on the induction of the transcription factor IRF-1 after LPS stimulation, since IRF-1, whose expression is controlled by STAT-1, was essential for iNOS induction and NO production in macrophages.¹⁵ IRF-1 induction was reduced approximately 2-fold in LPS-stimulated stat-moDCs compared to C-moDCs, as assessed by qRT-PCR analysis (Figure 3C). In line with this result, western blot analysis of STAT-1 phosphorylation revealed that LPS-mediated STAT-1 activation was less pronounced in stat-moDCs (Figure 3D).

Regulation of cytokine production by TLR-4 and IFNAR signaling in stat-moDCs

Our data demonstrate that lovastatin caused opposite effects on the responsiveness of stat-moDCs to LPS stimulation, by regulating positively TLR-4 signaling leading to an increased secretion of proinflammatory cytokines and IFN- β , and negatively regulating IFNAR signaling, leading to a reduced production of NO. However, regarding the increased IL-12 production by stat-moDCs, it is important to take into account that the active form of IL-12 is the heterodimer IL-12 p70, composed of the subunits IL-12 p40 and IL-12 p35, the expression of which has been proposed to be controlled by TLR-4 and IFNAR signaling, respectively.¹⁷ Lovastatin treatment would then be expected to cause a reduction in IL-12 p35 and thus, in IL-12 p70, since p35 has been claimed to be the limiting subunit for IL-12 production.¹⁸ However, stat-moDCs produced higher amounts of IL-12 p70 than C-moDCs in response to LPS (Figure 1E). To provide an explanation to this finding, we analyzed the contribution of the IFNAR pathway to LPS-mediated synthesis of IL-12, by quantifying in IFNAR^{-/-} mice, the production of IL-12 p70 at the protein level, and the expression of mRNA for IL-12 p40 and IL-12 p35. IFNAR^{-/-} moDCs produced around 2-fold less IL-12 p70 than C-moDCs (Figure 3E),

revealing that in LPS-stimulated moDCs both IL-12 p40 and p35 could be synthesized in the absence of IFNAR signaling. Indeed, in LPS-stimulated IFNAR^{-/-} moDCs, expression of IL-12 p40 was not significantly affected, whereas IL-12 p35 mRNA expression was reduced around 60%, indicating that, in moDCs, IL-12 p40 is controlled by the TLR-4 pathway, whereas both TLR-4 and IFNAR signaling contribute comparably to IL-12 p35 production.¹⁰ This result contrasts with published data proposing that in LPS-stimulated BMDCs IL-12 p35 synthesis was essentially controlled by IFNAR signaling, and supports that regulation of cytokine production might differ between moDCs and BMDCs. Therefore the increased IL-12 p70 production by stat-moDCs would reflect the balance between an increase in p40 and p35 due to the positive regulation of TLR-4 signaling, and a decrease in p35 resulting from the negative regulation of IFNAR signaling. On the other hand, IL-1 β and IL-6 production by moDCs was mostly dependent on TLR-4 signaling since mRNA expression for these cytokines was not significantly affected in IFNAR^{-/-} moDCs (Figure 3F).

The effects of lovastatin on the responsiveness of stat-moDCs to LPS were reverted by treatment with mevalonate (Supplemental Figure 2), demonstrating that they resulted from the inhibition of cholesterol synthesis and not from a direct effect of lovastatin on TLR4 and IFNAR signaling (see Supplemental data).

Cytoprotective potential of LPS-stimulated stat-moDCs

NO fulfills essential functions related to DC biology that include its microbicidal effect during immune responses against pathogens, and the induction of cytoprotective mechanisms against oxidative stress, among which the synthesis of HO-1 is crucial.¹⁹ HO-1 catabolizes cellular heme to carbon monoxide, that has anti-inflammatory properties, and to free iron and biliverdin, that both exert a strong antioxidant function by limiting the generation of free radicals and scavenging peroxy radicals. We thus analyzed whether the reduced NO production detected in LPS-stimulated stat-moDCs

was paralleled by a reduced induction of HO-1. Lovastatin treatment during monocyte differentiation strongly impaired HO-1 induction in LPS-stimulated stat- moDCs (Figure 4A). Accordingly, analysis by confocal microscopy of the transcription factor Nrf2, that regulates HO-1 synthesis²⁰ confirmed that LPS-induced Nrf2 translocation was significantly reduced in stat-moDCs (Figure 4B). Analysis of HO-1 induction in LPS-activated stat-moDCs and C-moDCs from IFNAR^{-/-} mice confirmed that the iNOS/NO/HO-1 pathway is strongly dependent on IFNAR signaling, and that its inhibition in stat-moDCs is due to the effect of lovastatin on IFNAR signaling. To assess whether the reduced HO-1 expression in stat-moDCs determined a defective cytoprotective potential against the LPS-induced production of reactive oxygen species (ROS), the level of ROS was analyzed on stat-moDCs and C-moDCs after LPS stimulation (Figure 4C). In C-moDCs, ROS levels slightly increased 16 h after LPS stimulation and were maintained along the next 24 h as a result of an effective cytoprotective effect. In contrast, 16 h after LPS stimulation, stat-moDCs started to accumulate ROS at levels above those present in unstimulated cells, reflecting a failure in their cytoprotective potential. In line with these observations, the kinetics of HO-1 expression revealed that HO-1 was detected on C-moDCs at 16 h after LPS stimulation, but not in stat-moDCs (Figure 4D).

Regulation of NO metabolism in moDCs during *Listeria* infection

To validate our *in vitro* data on the negative effect of lovastatin on the induction of NO metabolism in an *in vivo* model of bacterial infection, we analyzed the immune response against *Listeria monocytogenes*, that is dependent on the production of NO by a specialized subset of TNF/iNOS-producing moDCs, called TipDCs.¹² Mice treated with lovastatin for one week were injected intravenously with a sublethal dose of *Listeria*, and the induced immune response was analyzed in the spleen. No significant differences were found in the absolute number of total spleen cells, B cells, T cells or NK cells between lovastatin-treated or control (PBS-treated) mice, at day 0, 3, 6 or 9

after infection (Figure 5A). To determine the effect of lovastatin on NO production, we analyzed which splenic monocytic/DC subsets expressed iNOS at day 6 after infection, that corresponded to the peak of the splenic inflammatory response (it is important to note that there was a strict correlation between iNOS expression and NO production by LPS-stimulated moDCs; Supplemental Figure 3A). As shown in Figure 5B, after gating out the cells expressing CD49b (NK cells) or Ly-6G (granulocytes), the CD11c versus CD11b profile of a T/B cell-depleted splenic preparation allowed a clear definition of the main monocytic/DC subsets present in day 6-infected spleens. These included CD11c⁻/CD11b^{high} monocytes, CD11c^{int}/CD11b^{high} moDCs (or TipDCs), CD11c^{high}/CD11b^{int} conventional DCs (cDCs) and CD11c^{int}/CD11b^{int/low} cells, that comprised plasmacytoid DCs (pDCs) and DC precursors (preDCs). A strong increase in the absolute number of monocytes and moDCs was observed in control mice at day 6 after infection, compared to untreated/uninfected mice (Figure 5C). However, although monocyte recruitment was comparable in control and lovastatin-treated mice, the number of moDCs was significantly lower in the latter. No significant changes were detected in the number of cDCs, neither in control nor in lovastatin-treated mice. Intracellular staining of iNOS revealed that, in control mice, around 15% moDCs expressed iNOS at day 6 after infection, whereas iNOS was not detectable in none of the other DC subsets analyzed (Figure 5D).

Regarding granulocytes, both eosinophils, defined as Ly-6G^{low} side scatter (SSC)^{high}, and neutrophils, defined as Ly-6G^{high} SSC^{intermediate}, were detected in *Listeria* infected spleens. In control mice, around 4% eosinophils were iNOS⁺. Interestingly, two subsets can be defined within Ly-6G^{high} SSC^{intermediate} cells based on the forward scatter (FSC). Around 70% were FSC^{low} small cells, whereas around 30% were FSC^{high} large cells (Figure 5E). Small cells displayed the characteristic neutrophil morphology, whereas large cells had the hallmarks of immature or activated cells, and will be termed myelocytes (Figure 5F). Myelocytes expressed higher amounts of Ly-6C and F4/80 than neutrophils (Figure 5G), and around 8 % expressed iNOS, whereas

neutrophils did not express iNOS (Figure 5E). Whether myelocytes represent immature granulocytes or activated neutrophils remains to be investigated. Thus, iNOS-expressing cells in the spleen of *Listeria*-infected mice included moDCs, that corresponded to the TipDC subset originally described by Pamer and colleagues,¹² myelocytes and eosinophils. Taking into account the percentage of iNOS-positive cells, as well as their absolute number, moDCs constituted the main iNOS-expressing population (Figure 5H). Importantly, the percentage of iNOS-positive moDCs (and also of eosinophils and myelocytes) was notably reduced in lovastatin-treated mice (Figure 5D). This finding confirmed our *in vitro* data demonstrating that lovastatin caused a reduced iNOS expression and NO production by LPS-stimulated stat-mo DCs.

Since lovastatin treatment caused a reduction in the absolute number of moDCs (Figure 5C) and in the percentage of iNOS⁺ moDCs (Figure 5D), the absolute number of iNOS⁺ moDCs was dramatically decreased in lovastatin-treated mice (Figure 5H). Because NO production by TipDCs was claimed to be crucial for the outcome of *Listeria* infection,¹² we analyzed whether in lovastatin-treated mice, the reduction in iNOS⁺ moDCs correlated with an increased splenic bacterial load. Unexpectedly, the bacterial load was lower in lovastatin-treated than in control mice (Figure 5I). However, the absolute number of neutrophils, that have been demonstrated to be essential for the outcome of *Listeria* infection,^{21,22} was highly increased in the spleen of lovastatin-treated mice (Figure 5J); interestingly, lovastatin also promoted an increase in the number of neutrophils and myelocytes in the absence of infection (see Figure 5J). Therefore it could be hypothesized that in lovastatin-treated mice, the reduced NO production was compensated by the increased number of neutrophils, that would achieve a more efficient bacterial clearance. Alternatively, lovastatin treatment could promote an increased production of proinflammatory cytokines by splenic DCs, that could contribute to a more efficient immune response against *Listeria*. However, this seems unlikely because after *in vitro* stimulation by *Listeria* stat-moDCs produced

lower levels of NO than C-moDCs, but not higher amounts of proinflammatory cytokines, such as IL-12 or IL-6 (Supplemental Figure 3B).

Discussion

The aim of this study was to determine the physiological impact of statin treatment on the function of inflammatory DCs formed during microbial infections. Inflammatory DCs derive mainly from newly-recruited monocytes, and fulfill essential functions in innate and adaptive immunity.⁶ We have thus investigated the responsiveness to LPS of DCs differentiated from monocytes in the presence of lovastatin, or stat-moDCs, both *in vitro* and *in vivo*. In compliance with our initial objective, we have demonstrated that lovastatin positively regulated TLR-4 signaling, but negatively affected IFNAR signaling on LPS-stimulated stat-moDCs. Consequently, stat-moDCs produced higher amounts of proinflammatory cytokines and IFN- β , but displayed a defective activation of iNOS/HO-1 metabolism.

To provide an explanation to these opposite effects on the responsiveness of stat-moDCs to LPS, we had to investigate in parallel, by using IFNAR-deficient moDCs, the differential contribution of TLR-4 and IFNAR signaling to the production of proinflammatory cytokines and the induction of iNOS/HO-1 metabolism triggered by LPS. Our data, summarized in Figure 6, which proposes a theoretical model of LPS-induced signaling in moDCs, revealed that the production of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IFN β is dependent on TLR-4 signaling, that TLR-4 and IFNAR signaling similarly contribute to the synthesis of IL-12, and that the induction of iNOS/HO-1 is strongly dependent on IFNAR signaling, with a lesser although indispensable contribution of TLR-4 signaling.

Based on these findings, three major conclusions defining the specific response of moDCs to LPS stimulation, can be reached. First, IFN- β synthesis by LPS-stimulated moDCs is exclusively dependent on TLR-4 signaling. Consequently moDCs do not

have the ability to produce type I-IFN through an IFN- β -mediated autocrine IFNAR pathway. In this regard, CpG-stimulated plasmacytoid DCs produce high amounts of type-I IFN through IFNAR autocrine stimulation by an IRF7-dependent pathway,²³ and LPS-stimulated BMDCs differentiated in the presence of GM-CSF and TNF- α produce IFN- β by a mechanism dependent on IFNAR signaling.¹⁰ The inability of moDCs to produce type-I IFN after IFNAR signaling could be due to a defective activation of IRF-7, a process required for IFNAR-mediated type-I IFN production by CpG-stimulated pDCs,²³ or by BMDCs²⁴ and cDCs²⁵ subjected to sequential stimulation with IFN- β and LPS. Second, IL-12 production by moDCs is dually controlled by TLR-4 and IFNAR signaling, since IL-12 p40 is dependent on TLR-4, whereas both TLR-4 and IFNAR signaling contribute similarly to the production of IL-12 p35. This result contrasts with the widely accepted concept that IL-12 p35 production by DCs activated by TLR engagement is controlled by IFNAR/IRF-1 signaling.¹⁷ This conclusion was based on the finding that IL-12 p35 production was substantially reduced in IFNAR-deficient LPS-activated BMDCs,¹⁰ and in IRF-1-deficient CpG-activated BMDCs.²⁶ Third, the activation of iNOS/HO-1-mediated metabolism on LPS-stimulated moDCs is controlled by autocrine IFNAR signaling. Previous studies had revealed the importance of this pathway on the production of NO by macrophages,²⁷ but this issue has not been addressed, to our knowledge, on DCs. IFNAR-dependent activation of iNOS/HO-1 metabolism could be of special relevance in infectious processes during which specialized cell types, such as pDCs, produce high amounts of type-I IFN that could synergize with TLR-mediated signaling on moDCs for the induction of more efficient microbicidal and cytoprotective defense mechanisms. An important concept arising from our data is that the differential contribution of TLR-4 and IFNAR signaling to LPS-induced cytokine production and activation of iNOS/HO-1 metabolism might differ between different subsets of DCs and macrophages. Therefore, the signaling induced by TLR engagement on a given cell type cannot be incautiously extended to other cell

types, making it necessary to analyze specifically the responsiveness of the different DC subsets to TLR stimulation.

As pointed out above, positive regulation of TLR4 signaling in stat-moDCs led to the production of higher amounts of proinflammatory cytokines. Statin-mediated increase in proinflammatory cytokine production was reported for LPS-activated mouse BMDCs and peritoneal macrophages,^{3,28} and for human moDCs.⁴ Since the p38 MAP-kinase is crucial for the synthesis of proinflammatory cytokines and IFN- β by LPS-stimulated DCs,²⁹ the higher p38 activation observed in LPS-stimulated stat-moDCs could be responsible for their higher ability to secrete proinflammatory cytokines and IFN- β . In this regard, based on their increased production of IL-12, it could be hypothesized that stat-moDCs would be prone to promote Th1-polarized T cell responses. However, statin treatment was reported to cause a Th2 bias during experimental allergic encephalitis and autoimmune myocarditis,⁷ although the specific effect of statins on the DC Th1/Th2 polarizing potential was not addressed by these authors. This suggests that the overall effect of statin treatment on Th1/Th2 polarization at the systemic level counterbalances its effect on the polarizing ability of DCs. Moreover, it can be speculated that the effect of statins on a given cell type might not reflect its impact at the systemic level, that would be the result of the balance between the multiple effects caused by statins on different cell types.

Regarding the negative regulation of autocrine IFNAR signaling in LPS-activated stat-moDCs leading to a reduced expression of IRF-1 and a defective activation of iNOS/HO-1 metabolism, it has been reported that statin treatment inhibited IFN- γ -mediated STAT-1 activation in bone marrow-derived macrophages³⁰ and IFN- β -mediated STAT-1 activation in microglia.³¹ Lovastatin has been demonstrated to hamper iNOS and NO production by astrocytes³² but, to our knowledge, no reports have addressed the regulation of the IFNAR pathway and the activation of iNOS by statins on DCs. Interestingly, statins induce eNOS upregulation in

endothelial cells, possibly contributing to the beneficial effect of statins in atherosclerosis.⁷

Our *in vitro* data on the defective NO production by LPS-activated stat-moDCs were confirmed *in vivo* during the immune response against *Listeria*. This experimental model was chosen because, as previously discussed, it has been reported that during *Listeria* infection NO was mainly produced by TipDCs, a subset of splenic moDCs, and was critical for the outcome of the infection.¹² Interestingly, NO production by TipDCs is dependent on MyD88, but not on TLR-2 or TLR-4 signaling.³³ Our results revealed that in the spleen of *Listeria*-infected mice, moDCs, corresponding to TipDCs, were the main iNOS expressing cell subset, and that the percentage of iNOS-positive moDCs was strongly reduced in infected mice treated with lovastatin. Moreover, since the absolute number of moDCs was also lower in lovastatin-treated mice (suggesting that *in vivo* moDC differentiation could be partially blocked by lovastatin), the reduction in the absolute number of iNOS-positive moDCs after lovastatin treatment was even more pronounced. However, despite the low number of iNOS-positive moDCs, bacterial load was lower in lovastatin-treated mice. Therefore, in lovastatin-treated mice, the increase in the absolute number of neutrophils could counterbalance the defective induction of iNOS. In this regard, it has been reported that depletion of neutrophils during the early phase of *Listeria* infection led to an increased mortality,²¹ revealing their crucial role in bacterial clearance.

In conclusion, our results reveal that lovastatin treatment caused a profound defect in the induction of iNOS metabolism in moDCs during *Listeria* infection, validating our *in vitro* experiments on the effect of lovastatin on LPS-stimulated moDCs. These data indicate that lovastatin negatively affected the induction of iNOS on moDCs resulting from the engagement of a TLR distinct from TLR-4, revealing that the influence of lovastatin on iNOS/HO-1 is not restricted to LPS-mediated TLR signaling. On the other hand, the negative regulation caused by lovastatin on moDC iNOS metabolism during *Listeria* infection did not lead to an overall failure of the

immune system, probably due to the counteracting effect of lovastatin on the absolute number of neutrophils. Therefore it can be hypothesized that the final effect of statin treatment on immunity against microbial infections would reflect the end result of the differential effects that these drugs cause on different cell types and biological processes. Consequently, statin treatment could have severe implications during immune responses against pathogens or tumors in which the defective activation of iNOS/HO-1 metabolism caused by statins on moDCs is not counterbalanced by a potential beneficial effect of these drugs on other physiological functions.

Acknowledgements

We thank Keiko Ozato and Giorgio Trinchieri for critical reading of the manuscript, Caetano Reis e Sousa for IFNAR-deficient bone marrow samples, Thomas Decker for *Listeria monocytogenes*, Pilar Martín, Santos Mañes and Didier Soulat for experimental advice. This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2009-11592), Comunidad de Madrid (S-SAL-0304-2006), Ministerio de Sanidad (RD07/0064/0027) and Fundación Genoma España (MACIA project) to C.A.

Authorship

Contribution: P.M.D. designed and performed research, analyzed data and wrote the paper. M.L.-B. designed research and analyzed data. U.K. provided mice. C. A. designed experiments, analyzed data and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation*. 2000;101:207-213.
2. Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*. 2010;140:935-950.
3. Sun D, Fernandes G. Lovastatin inhibits bone marrow-derived dendritic cell maturation and upregulates proinflammatory cytokine production. *Cell Immunol*. 2003;223:52-62.
4. Yilmaz A, Reiss C, Weng A, et al. Differential effects of statins on relevant functions of human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2006;79:529-538.
5. Ghittoni R, Napolitani G, Benati D, et al. Simvastatin inhibits the MHC class II pathway of antigen presentation by impairing Ras superfamily GTPases. *Eur J Immunol*. 2006;36:2885-2893.
6. Dominguez PM, Ardavin C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev*. 2010;234:90-104.
7. Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:358-370.
8. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
9. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007;19:24-32.
10. Gautier G, Humbert M, Deauvieau F, et al. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med*. 2005;201:1435-1446.

11. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001;2:907-916.
12. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity.* 2003;19:59-70.
13. De Trez C, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Muraille E. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania* major infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog.* 2009;6:1-13.
14. Guillemins M, Movahedi K, Bosschaerts T, et al. IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection. *J Immunol.* 2009;182:1107-1118.
15. Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, et al. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science.* 1994;263:1612-1615.
16. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1994;269:4705-4708.
17. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity.* 2006;25:349-360.
18. Snijders A, Hilkens CM, van der Pouw Kraan TC, Engel M, Aarden LA, Kapsenberg ML. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *J Immunol.* 1996;156:1207-1212.
19. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 2003;24:449-455.
20. Srisook K, Kim C, Cha YN. Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: de-repression by heme and activation by Nrf2, the "one-two" punch. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:1674-1687.

21. Rogers HW, Unanue ER. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect Immun*. 1993;61:5090-5096.
22. Czuprynski CJ, Brown JF, Maroushek N, Wagner RD, Steinberg H. Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 1994;152:1836-1846.
23. Honda K, Yanai H, Negishi H, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 2005;434:772-777.
24. Sakaguchi S, Negishi H, Asagiri M, et al. Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306:860-866.
25. Richez C, Yasuda K, Watkins AA, et al. TLR4 ligands induce IFN-alpha production by mouse conventional dendritic cells and human monocytes after IFN-beta priming. *J Immunol*. 2009;182:820-828.
26. Negishi H, Fujita Y, Yanai H, et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:15136-15141.
27. Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, et al. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol*. 2002;3:392-398.
28. Matsumoto M, Einhaus D, Gold ES, Aderem A. Simvastatin augments lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses in macrophages by differential regulation of the c-Fos and c-Jun transcription factors. *J Immunol*. 2004;172:7377-7384.
29. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:55-72.
30. Lee SJ, Qin H, Benveniste EN. The IFN-gamma-induced transcriptional program of the CIITA gene is inhibited by statins. *Eur J Immunol*. 2008;38:2325-2336.

31. Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, et al. Suppressive effect of simvastatin on interferon-beta-induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neurosci Lett*. 2006;407:205-210.
32. Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest*. 1997;100:2671-2679.
33. Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:812-823.

Figure legends

Figure 1. Response of stat-moDCs to LPS stimulation.

(A) Phenotypic characterization of LPS-stimulated moDCs and stat-moDCs.

Histograms show the expression of the indicated activation molecules after gating for CD11c⁺ cells. White profiles correspond to background staining with streptavidin-PerCP.

(B) Quantitation of the expression of the activation molecules shown in A by LPS-stimulated C-moDCs and stat-moDCs, represented as mean fluorescence intensity (MFI).

(C) T cell stimulation capacity of stat-moDCs *in vivo*. OVA-pulsed C-moDCs or stat-moDCs were injected subcutaneously on the hind footpad of C57/BL6 Ly5.1 Pep^{3b} mice that had received 24 h before an intravenous injection of CFSE-labeled OVA-specific OT-II cells. OT-II cell proliferation was analyzed in the draining PO-LN by CFSE dilution. The percentage of OT-II cells that had undergone from 0 to 5 cell divisions, after stimulation with either C-moDCs or stat-moDCs, is represented as a mean \pm SD of 3 PO-LNs. (D) Production of the indicated cytokines by C-moDCs or stat-moDCs 16 h after LPS-stimulation analyzed by ELISA. Data are representative of 4 (A-B,D) or 2 (C) independent experiments with similar results.

Figure 2. TLR-4 signaling in LPS-activated stat-moDCs.

(A) Phosphorylation of p38 was analyzed by western blot on C-moDCs and stat-moDCs at the indicated times after LPS stimulation. Quantitation of p38 phosphorylation was performed by analyzing the phospho-p38/total p38 ratio using the Adobe Photoshop software. (B) Nuclear translocation of NF κ B p65 analyzed by confocal microscopy after staining with anti-p65 antibody on C-moDCs and stat-moDCs at the indicated times after LPS stimulation. Nuclei were stained using the DNA binding fluorescent dye DAPI. (C) Production of INF- β by C-moDCs and stat-moDCs analyzed by ELISA at 16 h after LPS stimulation. (D) Expression of IFN- β -specific mRNA analyzed by qRT-PCR on C-moDCs and stat-moDCs at the indicated times after LPS stimulation. Results are expressed as fold induction of IFN- β normalized to

actin. (E) Production of IFN- β by moDCs from wild type or IFNAR^{-/-} mice analyzed by ELISA at 16 h after LPS stimulation. Data are representative of 3 (A-C,E) or 2 (D) independent experiments with similar results.

Figure 3. IFNAR-dependent signaling in LPS-stimulated stat-moDCs.

(A) Production of NO by C-moDCs and stat-moDCs from wild type or IFNAR^{-/-} mice analyzed by the Griess reaction at 16 h after LPS stimulation. (B) Expression of iNOS analyzed by western blot on C-moDCs and stat-moDCs from wild type or IFNAR^{-/-} mice, at 16 h after LPS stimulation. Quantitation of iNOS expression was performed by analyzing the iNOS/actin ratio using the Adobe Photoshop software. (C) Induction of IRF-1-specific mRNA analyzed by qRT-PCR on C-moDCs and stat-moDCs at the indicated times after LPS stimulation. Results are expressed as fold induction of IRF-1 normalized to actin. (D) STAT-1 phosphorylation was analyzed by western blot on C-moDCs and stat-moDCs at the indicated times after LPS stimulation. Quantitation of STAT-1 phosphorylation was performed by analyzing the phospho-STAT-1/total STAT-1 ratio using the Adobe Photoshop software. (E) IL-12 p70 production and expression of mRNA specific for IL-12 p35 and IL-12 p40 were analyzed by ELISA (p70) and qRT-PCR (p35 and p40), on moDCs from wild type or IFNAR^{-/-} mice at 16 h after LPS stimulation. (F) Expression of IL-1 β and IL-6 mRNA analyzed by qRT-PCR on moDCs from wild type or IFNAR^{-/-} mice 16 h after LPS stimulation. Data are representative of 3 (A,B,D-F) or 2 (C) independent experiments with similar results.

Figure 4. Expression of HO-1 by LPS-stimulated stat-moDCs.

(A) Expression of HO-1 analyzed by western blot on C-moDCs and stat-moDCs from wild type or IFNAR^{-/-} mice, at 16 h after LPS stimulation. Quantitation of HO-1 expression was performed by analyzing the HO-1/actin ratio using the Adobe Photoshop software. (B) Nuclear translocation of Nrf2 analyzed by confocal microscopy after staining with anti-Nrf2 antibody on C-moDCs and stat-moDCs at the

indicated times after LPS stimulation. Nuclei were stained using the DNA binding fluorescent dye DAPI. (C) Analysis of ROS was performed on C-moDCs or stat-moDCs at different time points after LPS stimulation by cytofluorimetry, using the oxidative sensitive dye CM-H₂DCFDA. (D) Kinetics of HO-1 expression by C-moDCs and stat-moDCs at the indicated times after LPS stimulation. Data are representative of 3 (A-C) or 2 (D) independent experiments with similar results.

Figure 5. Effect of lovastatin treatment on the immune response to *Listeria*.

(A) Absolute number of total cells, B cells, T cells or NK cells in the spleen of control (PBS-treated) and lovastatin-treated mice at 0, 3, 6 or 9 days after infection. (B) Splenic monocytic/DC subsets at day 6 after infection of control mice, after depleting of T and B cells and gating out NK cells and granulocytes. cDCs, conventional DCs; pDCs; plasmacytoid DCs. (C) Absolute number of monocytes, moDCs and cDCs in the spleen of untreated/uninfected mice, as well as control and lovastatin-treated mice at day 6 after infection. (D) Expression of iNOS by splenic monocytic/DC/granulocytic cells at day 6 of infection of control and lovastatin-treated mice. (E) iNOS expression by neutrophils (Ly-6G^{high} FSC^{low}) and myelocytes (Ly-6G^{high} FSC^{high}) at day 6 of infection of control mice. (F) Micrograph of a Giemsa-stained cytospin preparation of MACS-sorted splenic Ly-6G⁺ cells at day 6 of infection of control mice, showing the morphology of neutrophils (blue circles) and myelocytes (red circles). (G) Expression of Ly-6C and F4/80 by splenic neutrophils and myelocytes at day 6 of infection of control mice. (H) Absolute number of iNOS⁺ cells within splenic moDCs, myelocytes and eosinophils at day 6 of infection of control and lovastatin-treated mice. (I) Bacterial load in the spleen of control and lovastatin-treated mice at day 6 and 9 after infection. (J) Absolute number of neutrophils and myelocytes in the spleen of untreated/uninfected mice, and of control and lovastatin-treated mice at day 0 and 6 after infection. Data are representative of 3 independent experiments with similar results.

Figure 6. Proposed model on the differential contribution of TLR4 signaling and autocrine IFNAR signaling to the production of proinflammatory cytokines and NO/HO-1 metabolism in LPS-activated moDCs, and its regulation by lovastatin treatment. Blue and red arrows indicate molecules positively- and negatively-regulated by lovastatin, respectively.

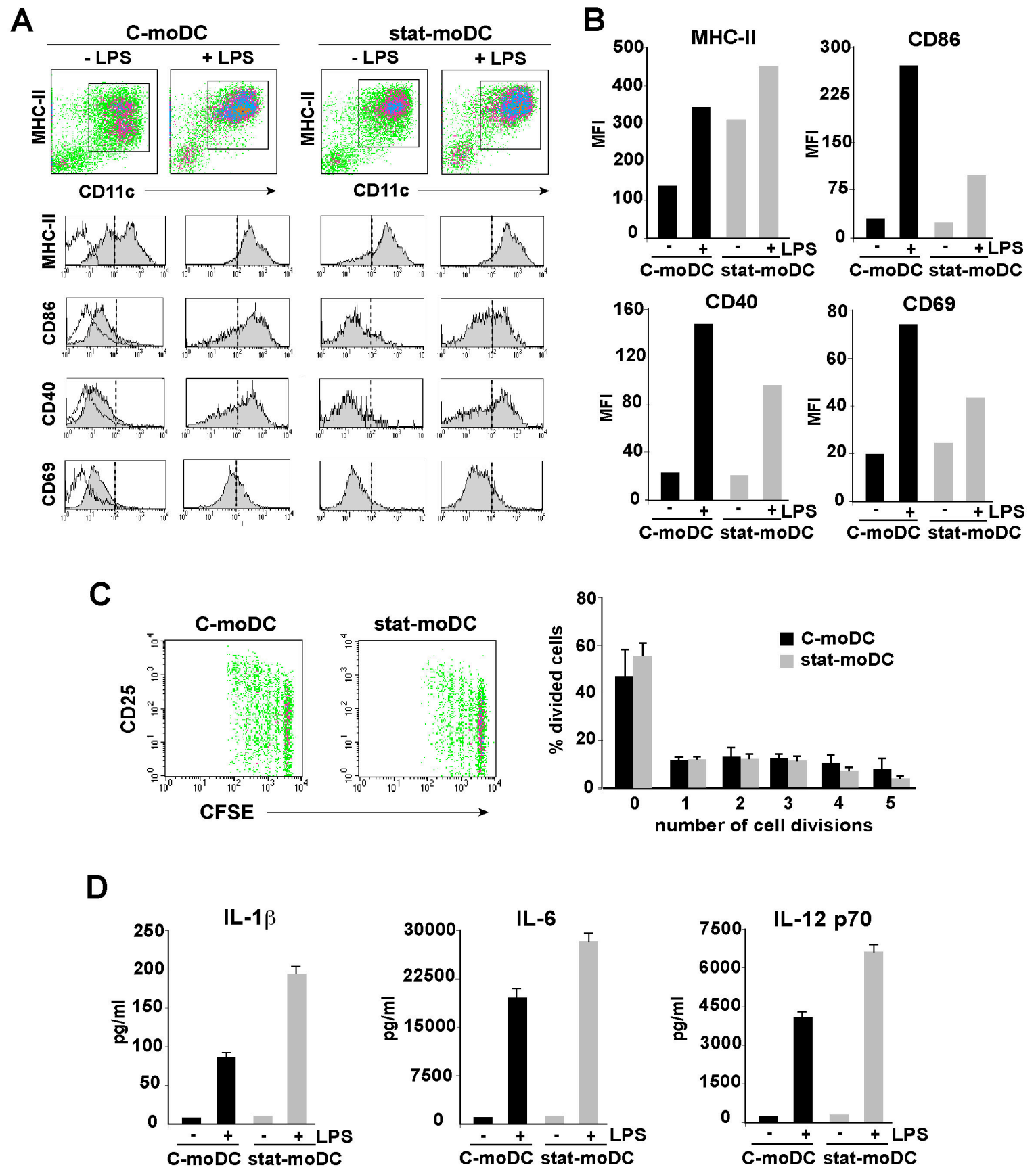


Figure 1

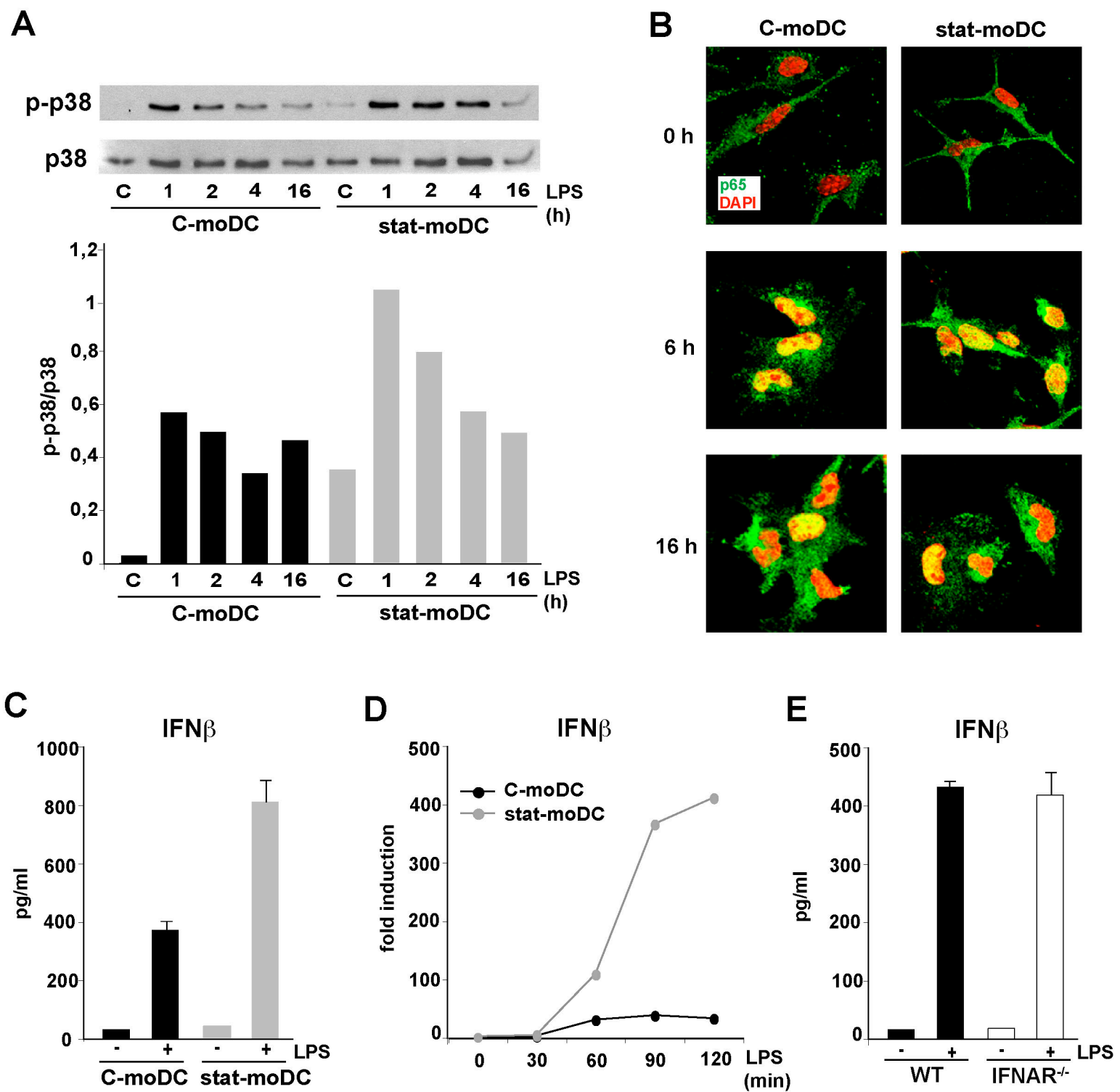


Figure 2

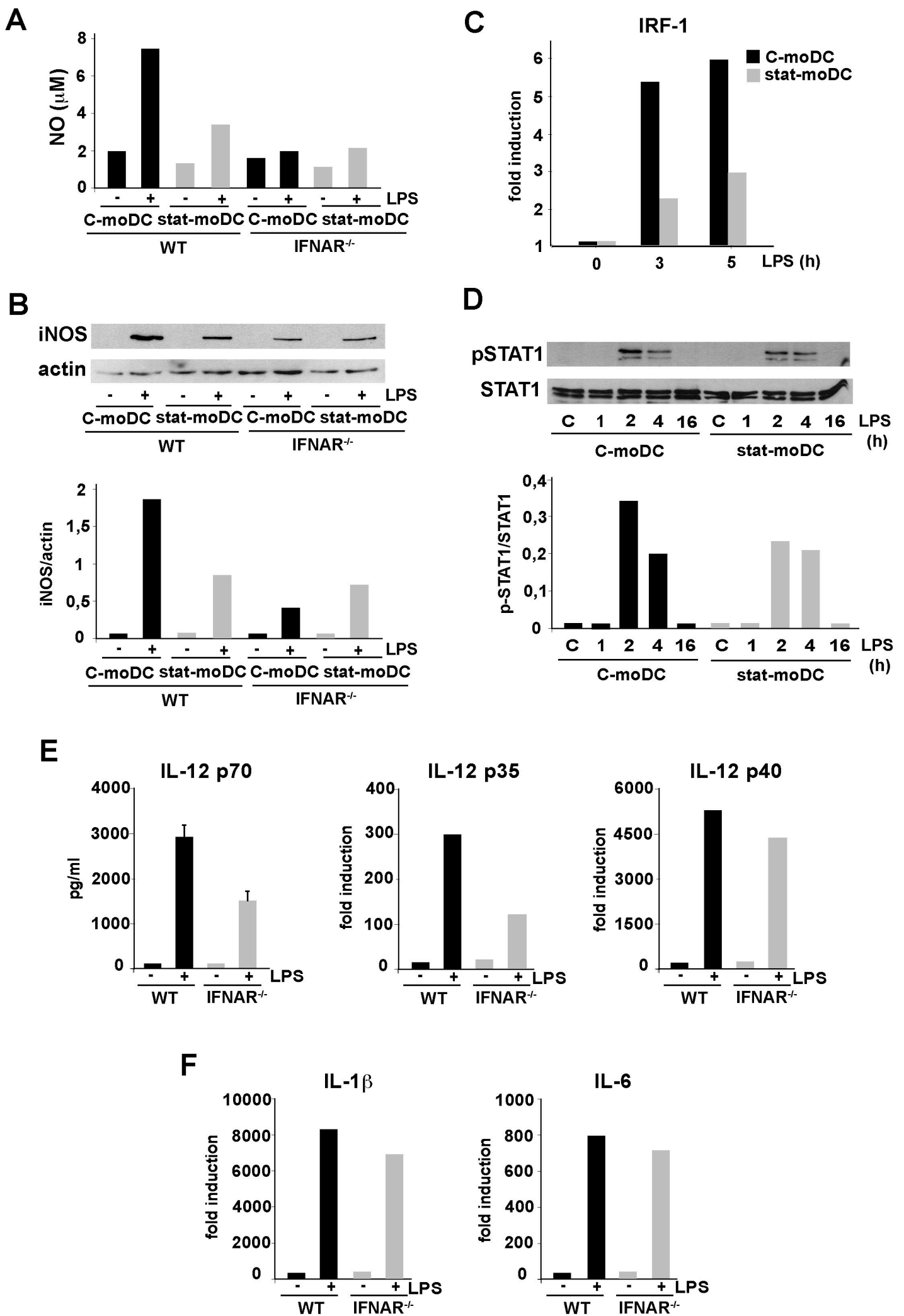


Figure 3

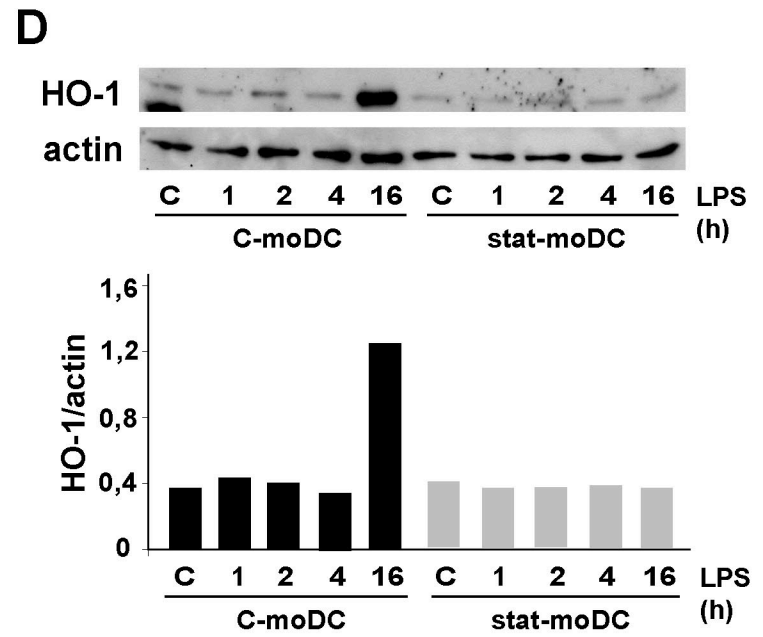
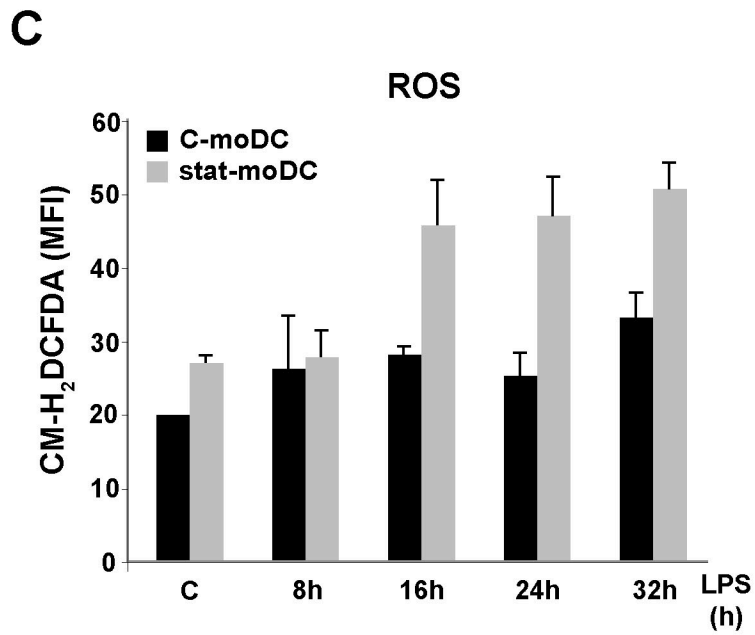
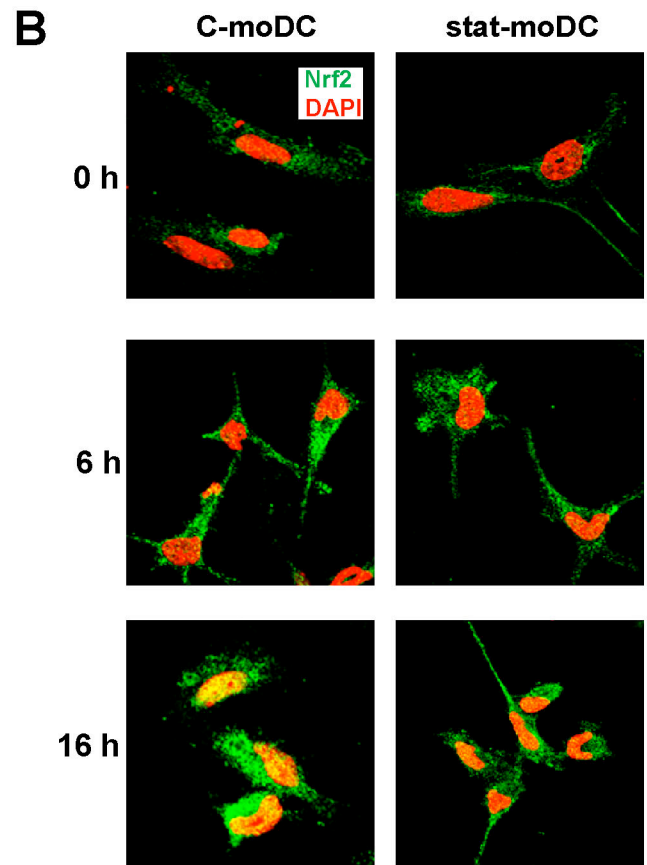
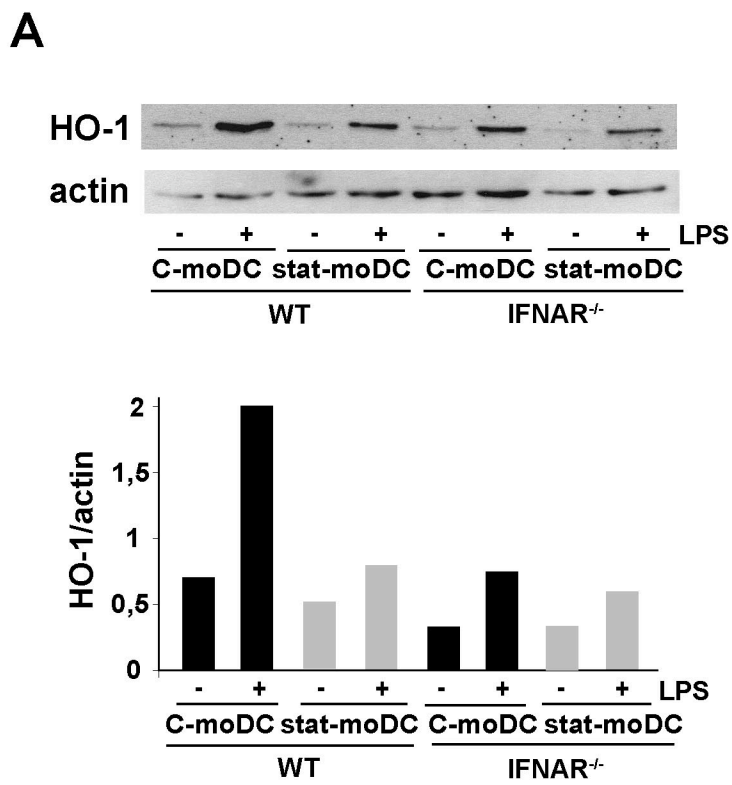


Figure 4

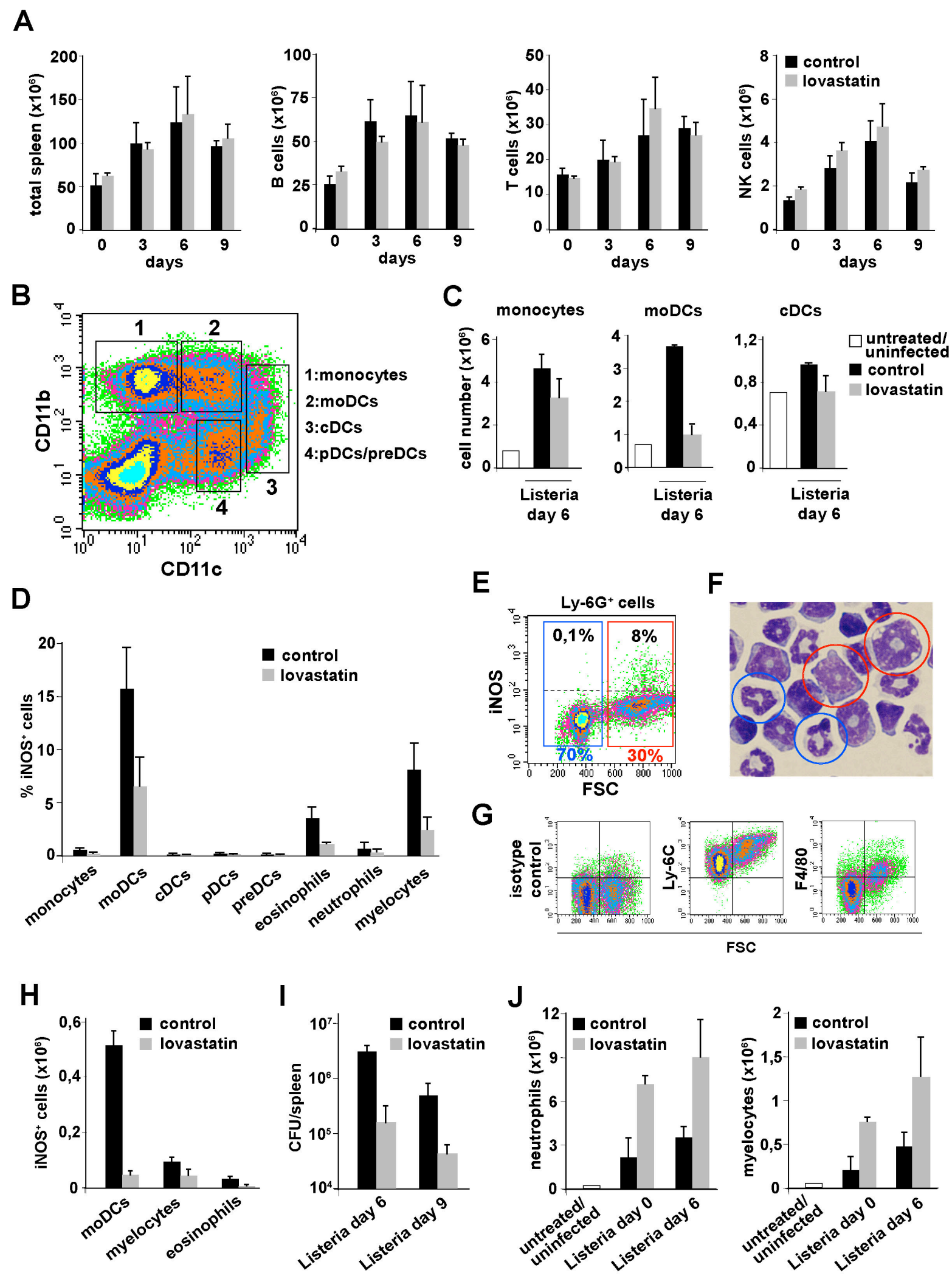


Figure 5

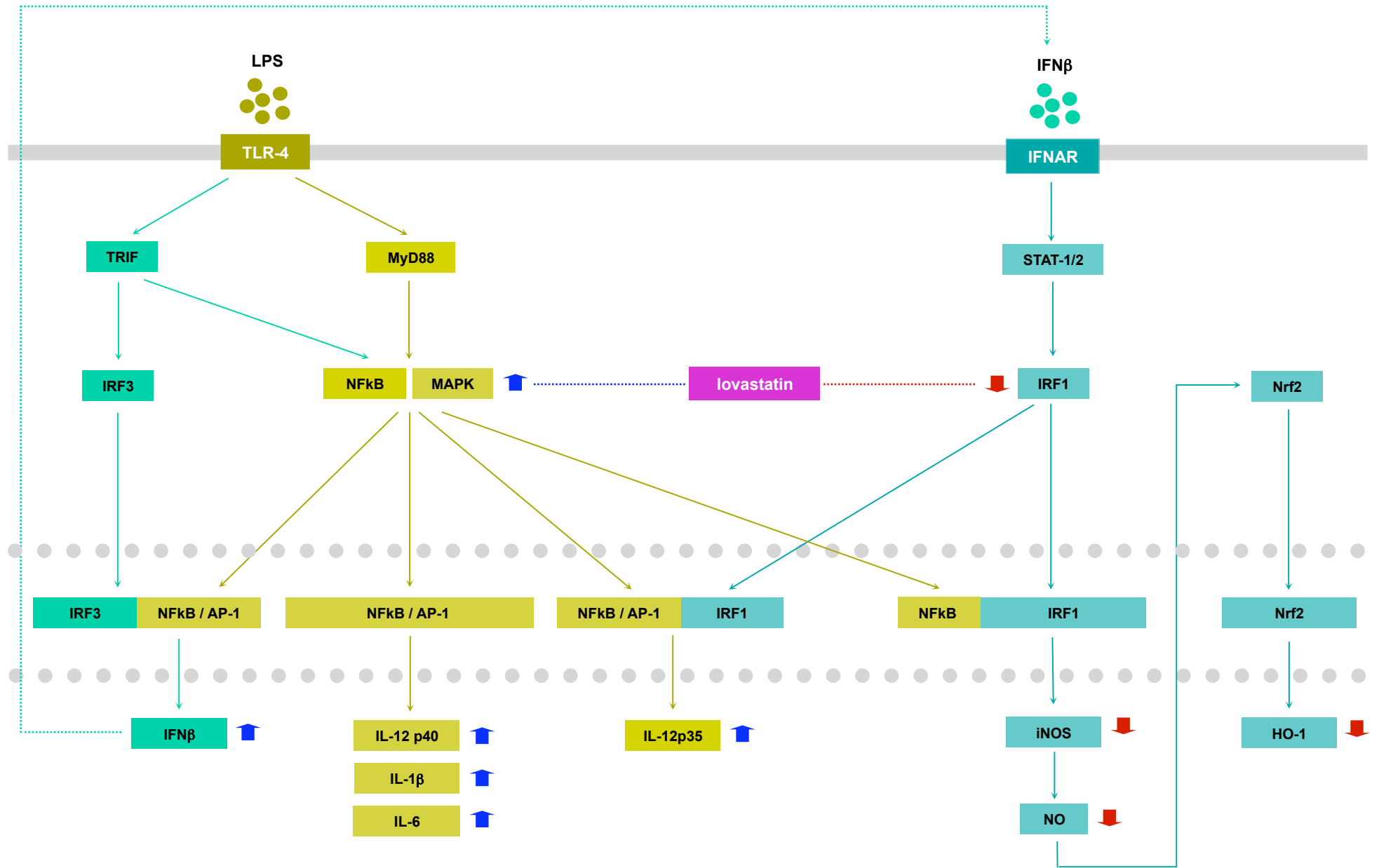


Figure 6

En primer lugar me gustaría agradecer a Carlos, mi jefe, por darme la oportunidad de empezar en el mundo de la investigación. Siempre he estado muy orgullosa de haber aprendido a trabajar en este grupo, que me ha formado como persona y como científico. Eres una persona a la que admiro y con la que se puede hablar (aunque no siempre estemos de acuerdo) y, por eso, me siento afortunada de haberte tenido como jefe.

Gracias Mary, por ser como eres y por haber estado ahí desde el primer día. Me has enseñado todo lo que sé y has sido un apoyo para todo. Ya sé que era muy pesada, pero por lo menos he aprendido bien, no?. El día a día contigo me ha hecho la vida muy fácil. Empezaste siendo una compañera, enseguida te convertiste en una amiga y después de todos estos años, eres como una hermana para mí.

A Leti, gracias por tu entusiasmo. Todas las mañanas tu energía me ayuda a empezar el día de buen humor. También por darme algo de tu espontaneidad, que me hacía falta... Es una suerte trabajar contigo porque tu eficiencia me facilita mucho el día a día. Y además me encanta saber que cuando lo necesito estás ahí para darme un abrazo porque me conoces muy bien.

A la otra maña del grupo, Elena, que confirmó que en Zaragoza se dice “acudo” y no es una palabra que me haya inventado!. Gracias por venir al congreso de Lisboa en el último momento, me lo pasé genial contigo y me encantó conocerte mejor; a Bea, por regalarnos a Obi; a María M, mi compañera de poyata, espero que en el tiempo que nos queda trabajando juntas nos llevemos tan bien como hasta ahora; a Patri por esas conversaciones y sus ánimos a últimas horas de la tarde; a Charlie (lo de Carlos no me sale) por su capacidad para integrar al grupo; a Didier, por obligarnos a hablar en inglés; aunque me queje me va a venir bien porque lo voy a necesitar; y a Ruth, por su simpatía y por ser tan buena gente.

A Pilar Martín, gracias por contagiar tus ganas de trabajar y de trabajar bien. Me parece increíble todo lo que me enseñaste en sólo 4 meses que compartimos laboratorio. De ti he aprendido que este trabajo no es fácil, que hay que luchar mucho, pero que al final tienes tu recompensa. Y a Ruth, la persona mejor informada del mundo, por esos ratos a mediodía con Mary que me ayudaban a desconectar.

A Jesús y Cris, por vuestro cariño y hospitalidad. Habéis estado ahí desde el principio, siempre ayudando a la gente que os rodea. Gracias por preocuparos por mí cuando Alberto se iba durante una temporada y por hacerme sentir como en casa. A Jesús Sánchez, por esos ratos hablando de cualquier cosa cuando nos cruzamos, que me alegran el día. Es una suerte haberte tenido en el laboratorio de al lado todos estos años. Y a Dani Lucas, que aunque coincidimos poco tiempo, has sido un amigo en la distancia. Gracias por abrirnos las puertas de tu casa y por aconsejarnos sobre nuestro futuro aprovechando tu propia experiencia.

A la gente del DIO con la que he compartido estos años: a Luis, echo de menos hablar contigo en la campana y tus comentarios ingeniosos; a Laura, que siempre tiene una sonrisa y unas palabras de ánimo; a Patri, la canadiense, la persona más simpática que he conocido; echo de menos nuestras charlas en el pasillo; a David, gracias por tu paciencia con las PCR... y por tu contagiosa alegría andaluza; a Sara, gracias por tu ayuda y por tu simpatía; a Ana, por estar siempre dispuesta a echarnos una mano y facilitarnos el trabajo; a Abel, por tu actitud positiva y tu entusiasmo para promover actividades, ya sean científicas, festivas o deportivas.

A mis amigas Isa, Bea (y los Jorges). Después de tantos años juntas, soy muy afortunada de poder seguir contando con vosotras. Aunque nuestros caminos se separaron, sé que cada vez que vuelva a Zaragoza estaréis ahí. Y por supuesto, espero vuestra visita en mi próximo destino! A las chicas de la carrera: Ana, Elena, Marisol, Blanca y Merche. Aunque nos hemos visto poco después de la universidad, me alegro de seguir teniendo contacto y de vernos aunque sea una vez al año. Sé que vosotras comprendéis bastante bien esta vida que hemos elegido.

Gracias especialmente a mis padres, por apoyarme cuando decidí cambiar de ciudad para dedicarme a la ciencia. Aunque sé que al principio fue difícil, comprendisteis que cada uno tiene que elegir cómo vivir su vida, como hicisteis vosotros. Estáis ahí cada día para ayudarme y escucharme y saber que puedo contar con vosotros me hace ser más fuerte. A Ana, Nacho y Fernando, que como buenos hermanos se preocupan de su hermana pequeña, que decidió irse a trabajar fuera. Gracias por vuestro interés por mi trabajo, aunque esté tan alejado de lo que hacéis vosotros, y por ser un apoyo a pesar de la distancia. Y a mis sobrinos, Laura, Jorge y Álvaro, que me hacen tan feliz cuando estoy con ellos. Quiero dar las gracias a mi otra familia, a Carmen, Ramón y Elena, por entender tan bien lo que supone dedicarse a la ciencia; me encanta poder compartir con vosotros el día a día de este trabajo. Y también por quererme como a una hija y una hermana. He tenido mucha suerte.

Y por último, a Alberto, como es lógico. Apareciste en mi vida y lo cambiaste todo... para bien. Sobre todo quiero darte las gracias por darme el empujón para dedicarme a lo que realmente me gustaba y por ver siempre lo mejor de mí. Quiero que sepas que te admiro, por tu capacidad de trabajo y tu inteligencia. Me encanta mi vida y te lo debo en gran parte a ti. También quiero agradecerte que estés a mi lado en los días buenos y en los malos y por hacerme la vida tan fácil (casi siempre). Te quiero y, como sabes, eres lo mejor que me ha pasado.

